

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES**

**JANINE MUNIZ TOLEDO**

**MODELOS, SIMULADORES, DOSIMETRIA E RESPOSTAS  
IMUNOLÓGICAS RADIOINDUZIDAS EM CINTILOGRAFIA DE  
PERFUSÃO DO MIOCÁRDIO**

Belo Horizonte

2014

JANINE MUNIZ TOLEDO

**Modelos, Simuladores, Dosimetria e Respostas Imunológicas  
Radioinduzidas em Cintilografia de Perfusão do Miocárdio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Técnicas Nucleares da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Doutora em Ciências e Técnicas Nucleares.

Área de concentração: Ciências das Radiações

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio Passos  
Ribeiro de Campos

Belo Horizonte

2014

Ao Sávio, meu esposo, com muito amor, admiração e gratidão.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tarcísio Passos Ribeiro Campos, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Prof. (a) Dra. Patrícia Lima Falcão, pela oportunidade de ingressar nas atividades de pesquisa, através do mestrado, com orientação e apoio. O que permitiu “colher os frutos” de hoje.

Ao Dr. Bruno Trindade, pela importante contribuição na realização do projeto, com o código SISCODES e MCNP.

À Prof. (a) Dra. Luciana Batista, pelo apoio durante o processo de construção do tecido equivalente, necessário á construção do modelo físico do coração.

Aos professores e colegas do Departamento de Engenharia Nuclear, em especial, Prof. (a) Dra. Cláudia, Prof. (a) Dra. Antonella e Prof. (a) Dra. Maria Auxiliadora, pelo constante apoio, amizade, compreensão e ensinamentos que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos tão especiais amigos, companheiros fiéis dessa linda jornada, Patrícia, Danilo, Sâmia, Fabiana, Mário, Maritza, Carlos, Bruno Teixeira, Humberto, Fabiano, Ivón, Rocky, Jean e todos aqueles que de alguma forma passaram e deixaram sua contribuição seja essa científica ou pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Com carinho e atenção agradecemos ao Hospital São Francisco e a Faculdade de Medicina Ciências Médicas de Minas Gerais.

Agradeço ao meu querido e amado esposo Sávio, e a minha família, meus pais César e Cida, e a meus queridos irmãos César Augusto, Fran (cunhada), Bárbara, Michel (cunhado) e lindíssima Samara.

“A nossa tarefa é descobrir o nosso trabalho e, então, com todo o coração dedicar-se a ele.” Buddha

## RESUMO

TOLEDO, J. M. Modelos, Simuladores, Dosimetria e Respostas Imunológicas Radioinduzidas em Cintilografia de Perfusão do Miocárdio. 2014. 134 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

As doenças cardiovasculares – DCV adquiriram maior importância durante o século XX, devido ao aumento da expectativa de vida da população em geral. Anualmente, milhões de pessoas apresentam diagnóstico de DCV. Essas podem ser avaliadas através de imagens radiológicas e cintilográficas, com a ajuda da Radiologia e da Medicina Nuclear. Os principais traçadores disponíveis para imagem do miocárdio incluem o tálio-201, o flúor-18 fluorodeoxyglucose - FDG, e os traçadores marcados com tecnécio-99-metaestável; principalmente o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e o  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrafosmin. A avaliação das doses durante o procedimento cintilográfico pode auxiliar em redução da exposição à radiação. Nesse contexto, foram realizadas investigações na elaboração da dosimetria para o coração, produzidas pelos possíveis radiofármacos empregados em cintilografia de perfusão do miocárdio, através de ferramentas computacionais, simulador físico, estudos radiobiológicos e possíveis efeitos determinísticos das radiações. No presente trabalho foi desenvolvido um fantoma físico do coração utilizando tecido à base de elastômero com valores de densidade mássica e composições químicas equivalentes ao tecido humano. Foi demonstrada a possibilidade de elaboração de um modelo tridimensional do coração, em formato Stereolithography - STL, com detalhamento anatômico de alta precisão para prototipagem rápida. A dosimetria do radiofármaco tálio-201 foi simulada com os códigos computacionais SISCODES E MCNP, elucidando a distribuição da dose absorvida no músculo cardíaco por unidade de atividade do radiofármaco empregado e do histograma dose versus volume. Complementando estes estudos, foi dada continuidade em investigações radiobiológicas e análise de efeitos determinísticos em linhagens de células mononucleares do sangue periférico – PBMC, e na análise dos linfonodos jugulodigástricos, em modelo animal. Foi mostrado que a radiação induziu diferenças fenotípicas nas linhagens celulares; reduzindo subpopulação de células T CD5 CD4, com aumento da expressão de CTLA-4. E, ainda, foi demonstrado através de análise histopatológica, que as células constituintes dos linfonodos em exposição à radiação, os linfócitos B, linfócitos T e tecido conjuntivo de sustentação, apresentaram processo inflamatório com morte celular e perda de função do linfonodo. Os resultados desse estudo reforçam a relevância de pesquisas voltadas a investigação da dosimetria em exames, como a cintilografia de perfusão do miocárdio, e os possíveis efeitos determinísticos que a radiação pode induzir em órgãos específicos, bem como auxiliará na escolha do radiofármaco mais adequado levando em consideração aspectos fundamentais e universais da radioproteção.

Palavras-chave: Perfusão do miocárdio. Histologia. Citometria de Fluxo. Dosimetria. Coração. Linfonodos, Simuladores.

## ABSTRACT

TOLEDO, J. M. **Models, Simulators, Dosimetry and Radiobiological Studies in Myocardial Perfusion Imaging**: 2014. 137 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

The cardiovascular diseases – CVD acquired greater importance during the twentieth century, due to increased life expectancy of the general population. Each year, a large number of individuals have a diagnosis of CVD. Those can be evaluated by the radiological and scintigraphic images, with the helping of the radiology and nuclear medicine. The main useful tracers for Myocardial Perfusion Imaging - MPI are thalium-201; fluor-18 fluorodeoxyglucose – FDG; and, the tracer target with technecium-99 metastable; mainly the  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi and the  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrafosmin. The dose evaluation of the scintigraphic procedure can auxiliary the radiation exposition reduction. On this context, investigations were performed in heart dosimetry, applied to the usual radiopharmaceuticals for MPI, based on computational tools, physical phantom simulators, and radiobiological studies. Following, investigations in radiobiology and in possible deterministic effects were addressed. At the present thesis, a physical heart phantom was developed made of tissue-elastomeric with mass density and chemical composition equivalent to the human tissues. A three-dimensional model of the heart, in stereolithographic format - STL, with anatomic details and high precision was developed for future fast prototyping. The radiopharmaceutical dosimetry for thalium-201 was simulated with the support of the SISCODES and MCNP codes, elucidating the spatial dose absorption at the cardiac muscle, per unit of radioisotope activity, and the dose versus volume histogram. Adding to these studies, radiobiological investigations were addressed, analyzing the deterministic effects in peripheral blood mononuclear cells – PBMC, and the analysis of the jugulodigastric lymph nodes, in an animal model. The findings was that the radiation induces phenotypic differences in cellular lines; reducing the subpopulation of T CD5 CD4 cells, with increasing of the CTLA-4 expression. And, it was demonstrated from the histopathology analysis that the constitutive cells of the lymph nodes after radiation exposition, the B and T lymphocytes and the conjunctive tissues presented an inflammatory process resulting cellular death and loss of the lymph nodes functions. The present results support the relevance of this investigation in the MPI dosimetry and in the deterministic effects stimulated by radiation in specific organs. These findings will help in the choosing the most appropriated radiopharmaceutical to MPI considering the fundamental and universal aspects of the radioprotection.

Key words: Myocardial Perfusion Imaging. Histology. Flow Citometer. Dosimetry. Heart. Lymph nodes, Phanthom.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão anterior do coração, ilustrando a posição do coração e das estruturas associadas na cavidade torácica.....	23
Figura 2. Visão anterior do coração, ilustrando as estruturas cardíacas. O saco pericárdico foi cortado, aberto e refletido sobre o diafragma.....	24
Figura 3. Vista posterior do coração.....	25
Figura 4. Superfície cardíaca inferior ou diafragmática, com o saco pericárdico refletido.....	26
Figura 5. Esquema do decaimento principal do tecnécio-99m.....	37
Figura 6. Fórmula estrutural da D-glicose natural e do sal de sódio 1-tio-b-D-glicose.....	48
Figura 7. Redenrização tridimensional a partir de 64 cortes de uma angiografia por TC fundido a cintilografia de perfusão miocárdica (SPECT).....	60
Figura 8. Imagens de um fantoma físico de coração com defeitos de tamanhos variados, envolto em meio de atenuação não uniforme, imagem SPECT quando preenchidos com $^{201}\text{Tl}$ ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , e no modo PET, preenchidos com FDG-18.....	61
Figura 9 Imagens cintilograficas de um estudo de perfusão miocárdica estresse-repouso com Tc-99m MIBI (SPECT/CT).....	62
Figura 10. Imagens de indução de estresse, defeito de perfusão reversível – Indicando miocárdio viável.....	62
Figura 11. Amostras de tecido cardíaco- equivalentes à base de elastômero.....	66
Figura 12. Imagem representativa de como foi feito o molde para o simulador físico do coração em silicone.....	67
Figura 13. Modelos preenchidos do simulador físico do coração, desenvolvimento após secagem em estufa. Vista do interior e após fechamento das partes, respectivamente.....	67
Figura 14. Vista frontal do fantoma do coração completo e sua respectiva imagem tomográfica em corte axial.....	68
Figura 15. Modelo inicial de imagem em corte coronal importada DICOM de uma angiotomografia de aorta torácica.....	72
Figura16. Modelos finais de imagens em cortes coronais importadas DICOM de uma angiotomografia de aorta torácica para construção do volume.....	72

Figura 17. Imagem final representativa do volume 3D.....	73
Figura 18. Imagens de tomografia do coração, modelo em voxel SISCODES e interface SOFT-RT em três dimensões, respectivamente.....	80
Figura 19. Legenda das cores e respectivos tecidos.....	81
Figura 20. Seções do modelo de voxel do coração na interface do MCNP5.....	81
Figura 21. Porcentagem em áreas de isodose dos valores de distribuição nas seções do coração.....	82
Figura 22. Imagem do coração depois do filtro e convertida a escalas de cinza com contraste..	82
Figura 23. Histograma da relação entre dose absorvida e porcentagem em volume.....	84
Figura 24. Imagem representativa da área irradiada, descrevendo uma janela de 13 x 17cm, incluindo totalidade de cabeça e pescoço, com proteção para os olhos.....	93
Figura 25. Histograma de fluorescência mostra a intensidade de fluorescência avaliados num canal médio de fluorescência que vai de 0 a 1023, para o número absoluto de receptores para CD5, numa cinética de tempo de 0 (zero), 2 horas e 18 horas e 30 dias após a irradiação com cobalto 60, considerando os valores positivos, a partir do canal 200 (a partir de M1). Os picos são representados pelas cores: lilás (2 horas-T2), azul (18 horas-T18) e preto (30 dias-T30). O pico em vermelho representa a marcação de células T totais CD5+ no tempo T0.....	96
Figura 26. Percentual médio de células CD5+ em linfócitos circulantes de cães irradiados. Os momentos do experimento são representadas por tempo 0 (zero), 2 horas e 18 horas após a irradiação com cobalto 60 nas doses previstas e após o trigésimo dia da irradiação. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero foram encontradas. Método estatístico utilizado - ANOVA seguido por teste-t de Student.....	97
Figura 27. Histograma de fluorescência mostra a intensidade de fluorescência avaliados num canal médio de fluorescência que vai de 0 a 1023, para o número absoluto de receptores para CD4+, numa cinética de tempo de 0 (zero), 2 horas e 18 horas e 30 dias após a irradiação com raios gama (cobalto 60), considerando os valores positivos, a partir do canal 200 (a partir de M1). Os picos são representados pelas cores: verde (Tempo zero-T0); preto (2 horas-T2), azul (18 horas-T18) e lilás (30 dias-T30). O pico em vermelho representa a marcação de células T totais co-expressando em sobreposição o receptor CD4+ nos tempos acima mencionados.....	98
Figura 28. Percentual médio de linfócitos CD4+ em linfócitos de cães irradiados. As etapas do experimento são representadas por tempo 0 (zero), 2 horas e 18 horas após a irradiação e após o trigésimo dia da irradiação. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero. O método estatístico utilizado foi ANOVA seguido por teste-t de Student.....	99

Figura 29. Histograma de fluorescência mostra a intensidade de fluorescência avaliados num canal médio de fluorescência que vai de 0 a 1023, para o número absoluto de receptores para CTLA-4, numa cinética de tempo de 0 (zero), 2 horas e 18 horas e 30 dias após a irradiação com cobalto 60, considerando os valores positivos, a partir do canal 200 (a partir de M1). Os picos são representados pelas cores: verde (Tempo zero-T0); lilás (2 horas-T2), azul (18 horas-T18) e preto (30 dias-T30). O pico em vermelho representa a marcação de células T totais co-expressando em sobreposição o receptor CTLA-4 nos tempos acima mencionados.....100

Figura 30. Percentual médio de linfócitos CTLA-4 em linfócitos CD5+ de cães irradiados. As etapas do experimento são representadas por tempo 0 (zero), 2 e 18 horas após a irradiação e após o trigésimo dia da irradiação. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo zero. O método estatístico utilizado foi ANOVA seguido por teste-t de Student.....101

Figura 31 Ausência de trabéculas e nódulos linfóides no centro do linfonodo jugulodigástrico direito (aumento 400X, coloração hematoxilinaeosina), e respectiva imagem ilustrativa de um linfonodo com trabéculas e nódulos linfóides (linfócitos agregados).....110

Figura. 32. Descontinuidade da cápsula do linfonodo jugulodigástrico esquerdo (aumento 400X, coloração hematoxilinaeosina).....111

Figura 33. Fibrose ordenada no centro do linfonodo jugulodigástrico esquerdo (aumento 400X, coloração hematoxilinaeosina).....112

## LISTA DE TABELAS

Tabela1. Principais formas de decaimento do tecnécio-99m.....	38
Tabela 2. Composição química e densidade de cada tecido presente no modelo voxel.....	79
Tabela 3. Dados experimentais da captação cardíaca do tálio em função do tempo.....	83

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	39
Equação 2.....	39
Equação 3.....	39
Equação 4.....	39
Equação 5.....	76
Equação 6.....	76
Equação 7.....	77
Equação 8.....	77
Equação 9.....	77
Equação 10.....	78
Equação 11.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Duas Dimensões ou Bidimensional  
3D – Três Dimensões ou Tridimensional  
ATC – Angioplastia Transluminal Coronariana  
ATM – Articulação Temporomandibular  
ATP – Trifosfato de Adenosina  
A-V – Válvulas Atrioventriculares  
CT – Tomografia Computadorizada  
CenPRA – Centro de Prototipagem Renato Archer  
CPPPA – Centro de Preparação de Peças e Pesquisas Anatômicas  
DALY – *Disability-Adjusted Life Years*  
DCV – Doença Cardiovascular  
DEN – Departamento de Engenharia Nuclear  
DFS – Distância Fonte Superfície  
DICOM – *Digital Imaging and Communications in Medicine*  
DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica  
ECG – Eletrocardiograma  
FDA – *Food and Drug Administration*  
FDG – Fluorodeoxyglucose  
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
ICRP – *International Commission Radiological Protection*  
ICRU – *International Commission on Radiation Units and Measurements*  
IPEN – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares  
JPEG – *Joint Photographic Expert Group*  
MCNP – *Monte Carlo N-Particle Transport Code*  
MIRD – *Medical Internal Radiation Dose*  
MMPs – Matriz Metaloproteinases  
NRI – Núcleo de Radiações Ionizantes  
PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico  
PET – *Photon Emission Tomography*  
RAS – *Renin Angiotensin System*  
RCM – Revascularização Cirúrgica do Miocárdio  
RIDIC – *Radiation Internal Dose Information Center*  
RIHD – *Radiation Induced Heart Disease*

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia

SPECT – *Single Photon Emission Computed Tomography*

SIMI – Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável

SISCODES – Sistema de Códigos para Cálculos de Dose Absorvida por Método Estocástico

TC – Tomografia Computadorizada

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

keV – quilograma-eletrovolt

mCi – mili-curie

mmHg – milímetro de mercúrio mSv – mili-sievert

mSv/MBq – mili-sievert/mega-becquerel

Rad/mCi – radiation absorbed dose/mili-curie

Sv – sievert

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>20</b>
2.1 Objetivos específicos.....	20
<b>3. ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO.....</b>	<b>21</b>
<b>4. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
4.1 Anatomia cardíaca.....	22
4.2 Bases da fisiologia do músculo e ciclo cardíaco (Guyton, 1969).....	26
4.2.1 Músculo cardíaco.....	26
4.2.2 Ciclo cardíaco.....	28
4.2.3 Período de contração isométrica.....	29
4.2.4 Período de relaxamento isométrico.....	30
4.2.5 Débito de trabalho cardíaco.....	30
4.2.6 Energia para contração cardíaca.....	32
4.3. Cardiologia Nuclear e patologias associadas.....	32
4.3.1 Radiofármacos mais utilizados em exames cardíacos.....	34
4.3.1.1 Tálcio 201 – <sup>201</sup> Tl.....	35
4.3.1.2 Tecnécio 99 metastável – <sup>99m</sup> Tc.....	37
4.3.1.3 Flúor 18 - Fluorodeoxyglucose (FDG).....	40
4.3.2 Fármacos associados ao <sup>99m</sup> Tc em cintilografia de perfusão do miocárdio.....	43
4.3.2.1 Sestamibi ou MIBI.....	44
4.3.2.2 Tetrafosfomin.....	45
4.3.2.3 Glucarato.....	46
4.3.2.4 1-tio-beta-D-Glicose.....	47
4.3.3 Imagens Cintilográficas.....	50
4.3.3.1 Tomografia Computadorizada por Emissão de Fotón Único-SPECT.....	51
4.3.3.2 Tomografia por Emissão de Pósitron-PET.....	55
4.3.3.3 Cintilografia de Perfusão do Miocárdio.....	57
4.4 Modelos e Objetos Simuladores.....	63
4.4.1 Monte Carlo N-Particle Transport Code-MCNP.....	63
4.4.2 Código SISCODES.....	64

<b>5. SIMULADORES FÍSICOS PARA DOSIMETRIA.....</b>	<b>65</b>
5.1 Desenvolvimento do simulador físico do coração.....	65
5.1.1 Métodos e resultados.....	65
5.2 Simulador tridimensional via Invesalius 3D.....	68
5.2.1 Métodos e resultados.....	70
<b>6. DOSIMETRIA EM CINTILOGRAFIA DE PERFUSÃO DO MIOCÁRDIO COM TÁLIO-201.....</b>	<b>74</b>
6.1 Métodos.....	74
6.1.1 Modelo do coração para cintilografia de perfusão do miocárdio.....	74
6.2 Resultados.....	78
6.3 Discussão.....	86
<b>7. ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DE PBMC PÓS IRRADIAÇÃO.....</b>	<b>90</b>
7.1 Introdução.....	90
7.2 Material e Métodos.....	93
7.3 Resultados.....	95
7.4 Discussão.....	101
7.5 Conclusão.....	105
<b>8. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO COMPARATIVO DE LINFONODOS JUGULODIGÁSTRICOS EM RADIOTERAPIA DE CABEÇA E PESCOÇO NO CÃO.....</b>	<b>107</b>
8.1 Introdução.....	107
8.2 Material e Método.....	108
8.3 Resultados.....	110
8.4 Discussão.....	112
8.4.1 Anatomia e fisiologia da drenagem linfática cervical.....	112
8.4.2 Reatividade linfonodal em tumores de cabeça e pescoço.....	113
8.4.3 Radioterapia no tratamento de linfonodos cervicais.....	114
8.4.4 Efeitos da radioterapia em linfonodos cervicais.....	117
8.4.5 Repercussões clínicas da radioterapia no tratamento de linfonodos cervicais.....	118
8.5 Conclusão.....	119
<b>9. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>120</b>
<b>10. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares - DCV adquiriram maior importância durante o século XX, com o aumento da expectativa de vida da população em geral. Nos Estados Unidos no ano de 1900, a expectativa de vida era de 47 anos; este número aumentou para 73 anos em 1999. E no Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, quem nasceu no ano 2000, poderá esperar viver em média 68,6 anos. Por outro lado, a urbanização ocorrida nos países desenvolvidos no século XX, e que chegou ao Brasil, trouxe consigo alguns problemas, como menor atividade física, alteração nos hábitos alimentares com maior consumo de gorduras, tabagismo e estresse. Este aumento da expectativa de vida, juntamente com os problemas decorrentes da mudança no estilo de vida das pessoas, acabou por determinar um aumento na incidência das doenças cardiovasculares, que surgem mais frequentemente, após os 50 anos de idade (PRATA, 1992).

Braunwald et al. (2003) relatam que este aumento global das DCV é resultado da drástica mudança no perfil de síndromes que acometiam os indivíduos, no decorrer do século XX. Já que até 1900, as doenças infecciosas e a desnutrição eram às causas mais comuns de óbito. Essas foram gradualmente suplantadas, em alguns países, pelas doenças crônicas, como as cardiovasculares e o câncer, graças em grande parte a melhora da nutrição e das medidas de saúde pública. Essas mudanças são chamadas de transições epidemiológicas, e elas nunca ocorrem isoladamente, mas sim associadas às alterações na saúde coletiva e pessoal (transição econômica), nas estruturas sociais (transição social) e demográficas (transição demográfica). E como as transições estão ligadas à evolução de forças sociais e econômicas, elas surgem em velocidades diferentes em todo o mundo.

O cenário projetado para 2020 pelo o indicador DALY (do inglês, *Disability-Adjusted Life Years*) evidencia que, entre as cinco principais causas de morte e incapacidade em adultos estão: as doenças isquêmicas do coração, depressão, acidentes de trânsito, doenças cerebrovasculares e a DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (SCHRAMM et al., 2004). Anualmente, milhões de pessoas apresentam diagnóstico de DCV. As lesões nas

superfícies do músculo cardíaco produzidas pela DCV podem ser avaliadas através das imagens radiológicas e cintilográficas, com ajuda da radiologia e da medicina nuclear (VIANA et al., 2008).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC (2002), nos últimos anos a cintilografia planar do miocárdio produzido em gama-câmaras, foi amplamente substituída pela cintilografia através de varredura tomográfica, em especial pelo SPECT (do inglês, *Single Photon Emission Computer Tomography*). Um número elevado de centros de medicina nuclear que disponibilizam o exame de perfusão do miocárdio em SPECT está distribuído em todo o território nacional, possibilitando o acesso a essa tecnologia em praticamente todas as grandes cidades brasileiras. O abandono das imagens cardíacas planares produzidas em gama-câmaras na rotina clínica deve-se ao avanço tecnológico, com a utilização da capacidade computacional de alto desempenho que permite a reprodução de imagens do miocárdio em seções milimétricas. Sistemas utilizando mais de um detector podem diminuir o tempo de aquisição de cada exame. As imagens tomográficas são superiores às imagens planares, facilitando a separação de regiões vizinhas, melhorando a resolução de contraste e permitindo uma melhor detecção das diferenças nas concentrações de atividade no miocárdio; permitem também, que as regiões isquêmicas, até mesmo de pequeno tamanho, sejam detectadas em meio a um tecido, com concentração relativamente normal de um radiofármaco.

No Brasil existem aproximadamente 300 operações de rotina em medicina nuclear, executadas em hospitais públicos e clínicas particulares, e o Tecnécio-99 metaestável, Tc-99m, ainda é o radionuclídeo mais utilizado (DANTAS et al., 2005).

As imagens cardíacas podem ser adquiridas de forma sincronizada com eletrocardiograma - ECG do paciente, permitindo a análise da função ventricular adicionalmente e de forma simultânea à análise da perfusão miocárdica. Estas informações adicionais têm valor diagnóstico e prognóstico muito importante. O avanço tecnológico que permitiu a análise adicional da função ventricular tem contribuído de maneira significativa na rotina clínica. Os principais traçadores, disponíveis, para imagens do miocárdio incluem o tálio-201 e os traçadores marcados com tecnécio, entre eles, principalmente o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi e o  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmin, e o flúor - 18, como o fluorodeoxyglucose ou FDG (SBC, 2002). Assim, tálio-

201, tecnécio-99m e flúor 18 são os radionuclídeos utilizados para realização do exame de perfusão de cintilografia do miocárdio.

Como a cintilografia miocárdica é um exame que produz dose absorvida para o paciente e para o corpo clínico, em medicina nuclear, a avaliação das doses durante o procedimento cintilográfico pode auxiliar no equacionamento da mesma permitindo uma possível redução da exposição à radiação para os indivíduos envolvidos.

O estudo da dosimetria pode também auxiliar na melhor escolha do radiofármaco em função não só da qualidade de imagem, mas também, pela redução da dose absorvida no coração em cintilografia de perfusão do miocárdio. E esses são aspectos fundamentais universais da radioproteção.

Nesse contexto, é importante que se realizem investigações na elaboração de uma dosimetria mais acurada para o coração, produzidos pelos possíveis radiofármacos empregados na perfusão do miocárdio. Então, para atingir tal fim, devido à complexibilidade desta tarefa, se fez necessário elaborar ferramentas computacionais, simuladores físicos e estudo das respostas imunológicas radioinduzidas no exame de cintilografia de perfusão do miocárdio.

## **2 OBJETIVO GERAL**

É objetivo geral a investigação da dosimetria dos radiofármacos em perfusão do miocárdio, usando como ferramentas simuladores computacionais e simulador físico do coração, onde também serão avaliadas respostas imunológicas radioinduzidas em linhagens de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de linfonodos jugulodigástricos em modelo animal.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **Desenvolvimento de Modelos e Simuladores do Coração:**

- Desenvolvimento de um simulador físico do coração;
- Desenvolvimento de um simulador computacional do coração, para reprodução em prototipagem, e em modelo de voxels para dosimetria;

#### **Dosimetria da Perfusão do Miocárdio:**

- Dosimetria do tálio-201;

#### **Estudos Radiobiológicos:**

- Investigação de parâmetros fenotípicos em linhagem PBMC, modelo animal.
- Estudo histopatológico comparativo de linfonodos jugulodigástricos irradiados;

### **3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO**

O presente documento é uma apresentação como um Portfólio, e as riquezas das pesquisas desenvolvidas, organizado em nove capítulos. É apresentado nesse capítulo o tema principal da tese, objetivos gerais e específicos. A revisão de literatura é apresentada no capítulo 4, onde se dá ênfase aos estudos de cintilografia do miocárdio. O capítulo 5 apresenta o desenvolvimento de simuladores computacionais e físicos do coração para dosimetria. O capítulo 6 apresenta a dosimetria em cintilografia de perfusão do miocárdio com tálio-201. Os capítulos 7 e 8 apresentam os resultados referentes aos estudos em modelo animal da resposta radiobiológica das radiações. Assim, o capítulo 7, apresenta investigações de parâmetros fenotípicos em linhagem de células mononucleares – PBMC, em língua inglesa. E, o capítulo 8 apresenta o estudo histopatológico comparativo de linfonodos jugulodigástricos irradiados. E por fim, o capítulo 9 apresenta as conclusões gerais.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Anatomia cardíaca

Para melhor entender as consequências funcionais das doenças cardiovasculares - DCV é necessário compreender a anatomia e a fisiologia cardíaca.

O coração é envolvido por uma membrana serosa, o pericárdio, que repousa no compartimento mediastinal do tórax, entre as duas cavidades pleurais. Dois terços do coração se estendem à esquerda da linha média do corpo. Este órgão consiste de quatro câmaras musculares, dois átrios e dois ventrículos e estruturas associadas. O lado direito (átrio e ventrículo direitos) recebe sangue das demais partes do corpo e o bombeiam para dentro do sistema arterial pulmonar de baixa pressão, enquanto o lado esquerdo do coração (átrio e ventrículo esquerdos) recebe sangue dos pulmões e o bombeia para dentro do sistema circulatório de alta pressão. Os septos interatrial e interventricular separam os átrios e ventrículos direito e esquerdo uns dos outros (WOODS et al., 2005).

O eixo longo do coração está orientado, obliquamente, para a esquerda, para baixo e para frente. Qualquer fator que altere a forma do tórax muda a posição do coração e modifica o eixo direcional. As alterações respiratórias no nível do diafragma e a expansão da caixa torácica podem mudar o eixo cardíaco. Assim em uma inspiração profunda, o coração desce e adota uma posição mais vertical. Os fatores que podem causar variações no eixo em pessoas saudáveis incluem idade, peso, gravidez, formas do corpo e do tórax. Geralmente, uma pessoa magra e alta tem o coração mais verticalizado, enquanto a obesa e baixa, o tem mais horizontalizado. Condições patológicas do coração, pulmões, órgãos abdominais influenciam a direção do eixo cardíaco (WOODS et al., 2005).

As superfícies do coração são usadas para referenciar sua posição em relação a outras estruturas e para descrever a localização do dano, como em um infarto do miocárdio. O ventrículo direito, partes do átrio direito e o ventrículo esquerdo formam a superfície cardíaca

anterior ou esterno costal. O átrio e ventrículo direitos repousam anteriormente e à direita do átrio e do ventrículo esquerdo, no plano frontal. Assim, quando visto de frente, o coração parece estar deitado de lado, voltado para frente e para a esquerda, com seu lado direito à frente (WOODS et al., 2005).

As figuras de 1 a 4, adaptadas da literatura, facilitam a compreensão das estruturas cardíacas. A figura 1 ilustra a visão anterior do coração com posicionado em relação às estruturas presentes na cavidade torácica.

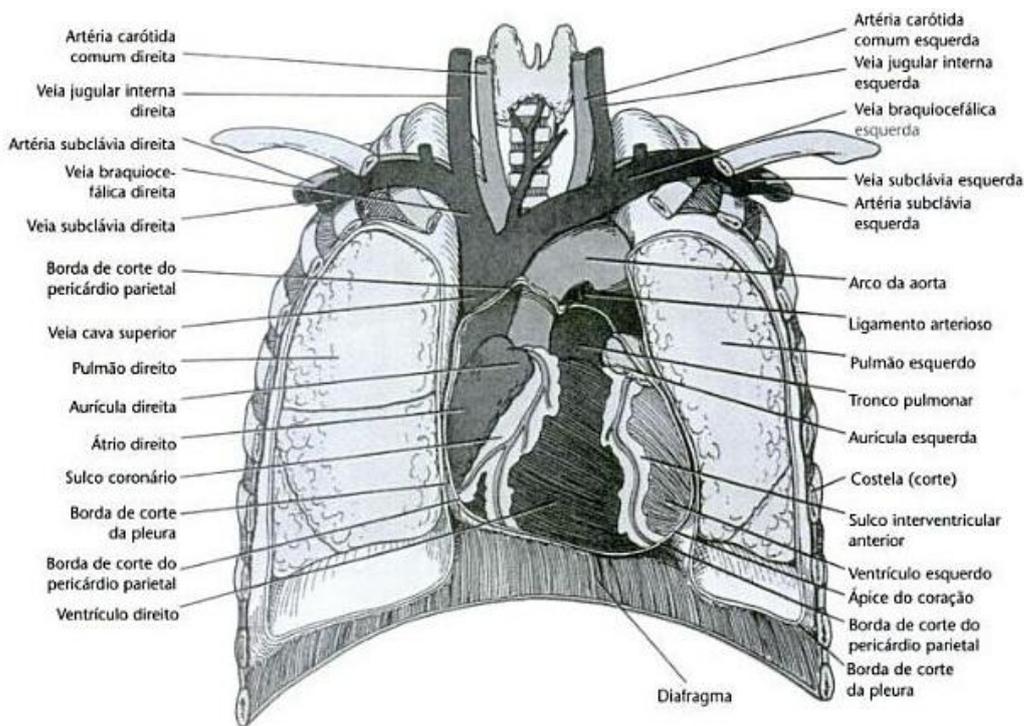


Figura 1 – Vista anterior do coração, ilustrando a posição do coração e das estruturas associadas na cavidade torácica. Fonte: Enfermagem em Cardiologia, anatomia e fisiologia, quarta edição, parte 1, pg.4, 2005.

A figura 2 mostra a visão anterior além das principais estruturas cardíacas.

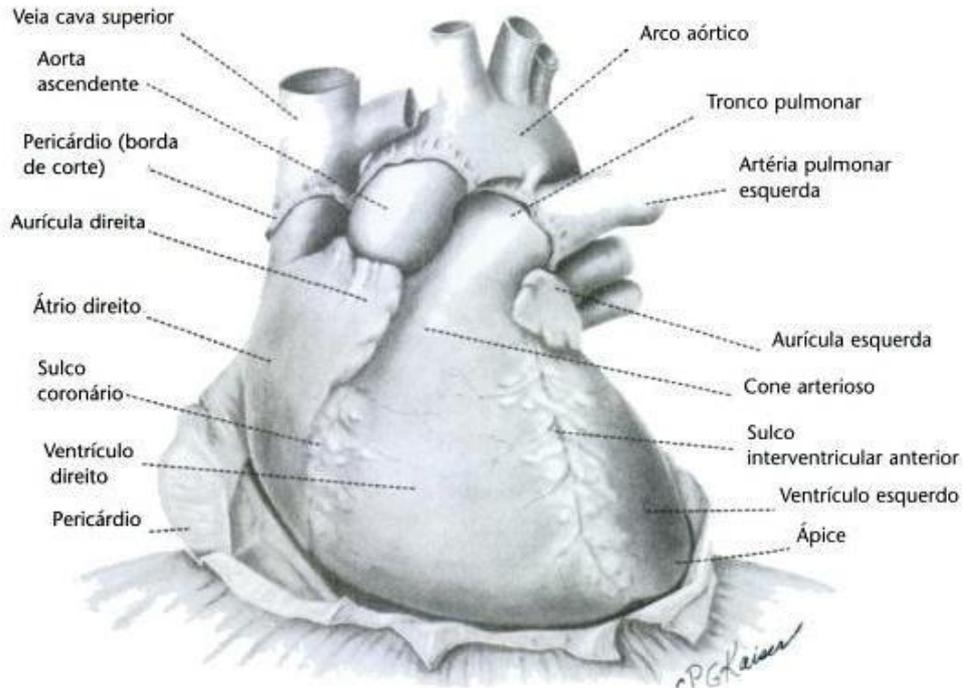


Figura 2 – Vista anterior do coração, ilustrando as estruturas cardíacas. O saco pericárdico foi cortado, aberto e refletido sobre o diafragma. Fonte: Enfermagem em Cardiologia, anatomia e fisiologia, quarta edição, parte 1, pg.4, 2005.

Por sua vez, a figura 3 ilustra a visão posterior.

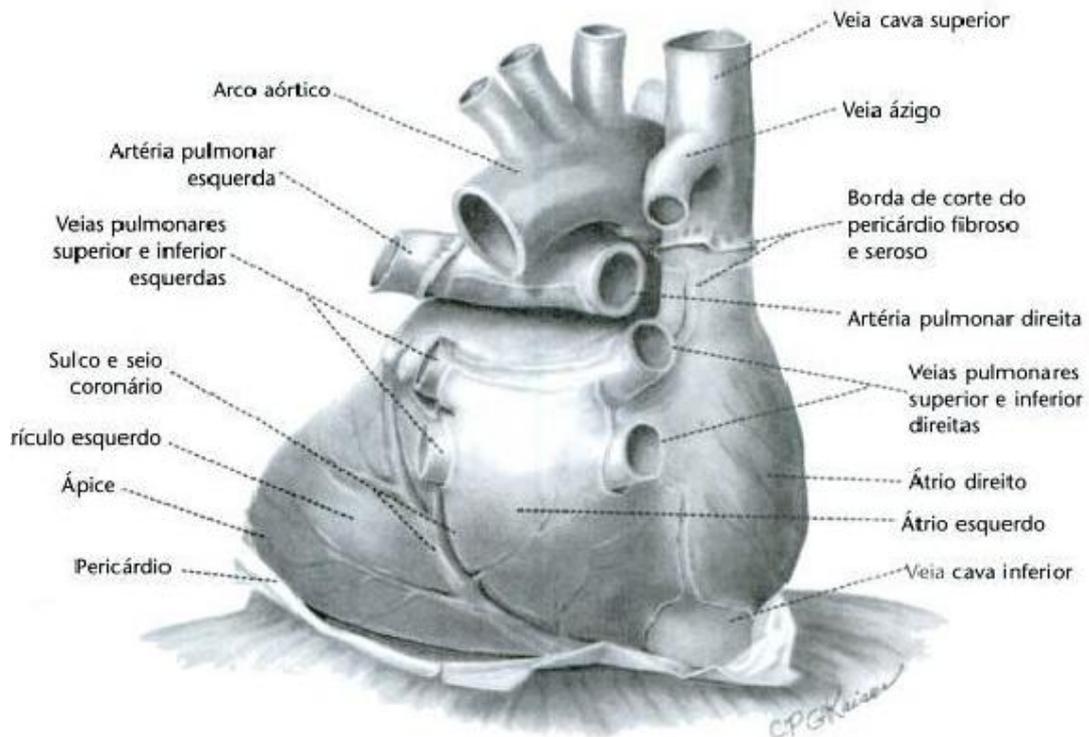


Figura 3 – Vista posterior do coração. Fonte: Enfermagem em Cardiologia, anatomia e fisiologia, quarta edição, parte 1, pg.5, 2005.

Enquanto, a figura 4 apresenta as superfícies cardíacas inferiores e diafragmáticas.

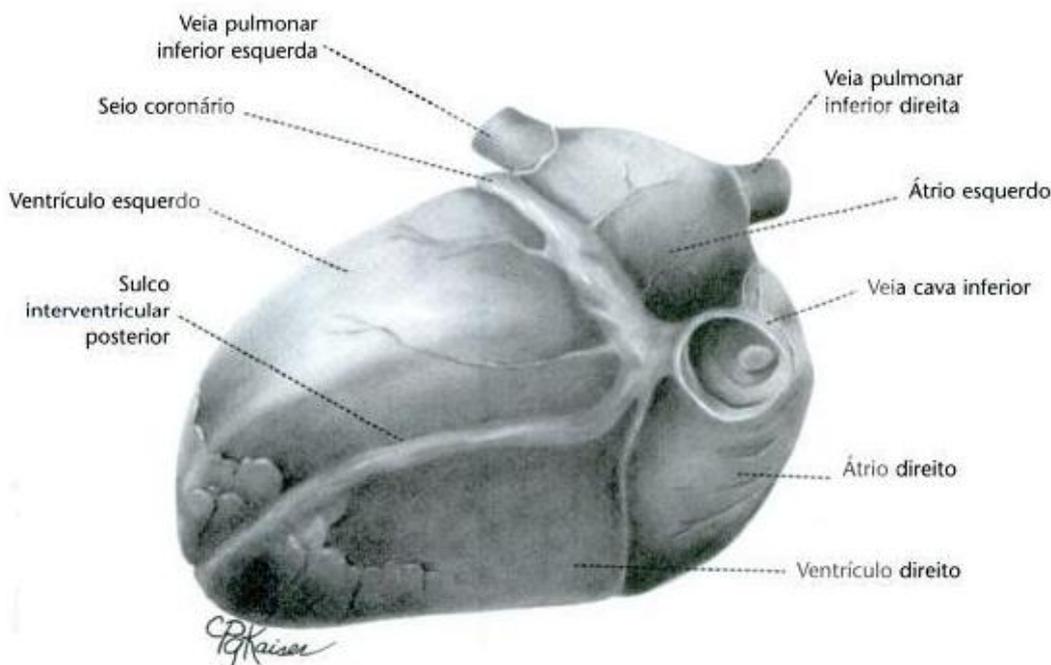


Figura 4 – Superfície cardíaca inferior ou diafragmática. Fonte: Enfermagem em Cardiologia, anatomia e fisiologia, quarta edição, parte 1, pg.5, 2005.

## 4.2 Bases da fisiologia do músculo e ciclo cardíaco (Guyton, 1969).

### 4.2.1 Músculo cardíaco

O coração é uma bomba muscular que se contrai ritmicamente para enviar o sangue pela circulação e, desta maneira, manter os fluidos corporais misturando-se continuamente. Mecanismos especiais promovem a ritmicidade e transmitem potenciais de ação, através da musculatura cardíaca, para iniciar a contração.

O coração é composto de três tipos principais de músculo: músculo auricular, ventricular e fibras musculares excitatórias e condutoras. O músculo cardíaco é estriado, possui miofibrilas típicas, contém filamentos de actina e miosina que se entrelaçam e deslizam um sobre o outro,

durante o processo de contração. Envolvendo as miofibrilas, encontra-se o retículo sarcoplasmático, responsáveis pelo armazenamento dos íons de cálcio e transmissão dos potenciais de ação para as fibras musculares. As células musculares cardíacas estão ligadas de um modo tão estreito, que quando uma delas se torna excitada, o potencial de ação se difunde para todas as outras com facilidade.

Sabe-se que, três cátions em particular, sódio, potássio e cálcio, possuem efeitos marcantes para a transmissão do potencial de ação. Parte da origem do processo contrátil ocorre quando, a actina combina-se com o trifosfato de adenosina – ATP; e a miosina, em presença de quantidades adequadas de íons de cálcio leva o ATP a liberar grandes quantidades de energia. E quando o músculo deixa de ser estimulado, as cargas eletrostáticas desaparecem e, então o músculo relaxa; isto é, o potencial de ação provoca a liberação de íons de cálcio, da combinação com uma substância que faz parte do retículo sarcoplasmático, denominada fator de relaxamento. Os íons de cálcio se difundem rapidamente dentro das miofibrilas, e aí catalisam as reações químicas que promovem o deslizamento dos filamentos de actina e miosina, uns sobre os outros; isto produz a contração muscular. Logo após o final do potencial de ação, os íons de cálcio começam a religar-se com o fator de relaxamento, no retículo sarcoplasmático, de tal maneira que, dentro de alguns milésimos de segundo, a densidade dos íons de cálcio cai abaixo do nível necessário para manter a contração; como resultado o músculo relaxa. Pode-se dizer que ocorreu processo contrátil e seu acoplamento com potencial de ação.

Quanto maior a voltagem do potencial de ação e quanto mais longa sua duração, maior será o trabalho liberado pela musculatura cardíaca. A razão parece ser que, tanto o aumento da voltagem, quanto o aumento da duração do potencial de ação fazem crescer a quantidade de íons de cálcio liberados ao interior das fibras musculares, o que, aumenta as reações químicas do próprio processo contrátil.

Quando a frequência do coração aumenta, a duração de cada ciclo cardíaco diminui. A duração do potencial de ação e do período de contração também diminui, mas em porcentagem menor que o ciclo cardíaco inteiro. Por isso, o quociente do tempo de contração, para o tempo de relaxamento, cresce com o aumento da frequência cardíaca. Numa frequência

cardíaca normal de 72 batimentos por minuto, o período de contração é de 40% de um ciclo completo. Em uma frequência três vezes acima do normal, esse período é em torno de 65% de todo o ciclo; isto significa que o coração, em certas condições, não permanece relaxado o tempo suficiente para permitir um enchimento completo das câmaras cardíacas, antes da próxima contração.

#### **4.2.2 Ciclo cardíaco**

O coração funciona como uma bomba de quatro câmaras, pulsátil, composta de duas aurículas e dois ventrículos. As aurículas trabalham como vestíbulos ventriculares e também bombeiam de modo fraco a fim de ajudar na movimentação do sangue, que passa para os ventrículos, através delas. Os ventrículos fornecem a força principal, que impulsiona o sangue através dos pulmões e do sistema circulatório periférico.

O ciclo cardíaco consiste em um período de relaxamento, denominado diástole, seguido por um período de contração, denominado sístole. Durante a diástole as câmaras cardíacas se enchem de sangue, e, durante a sístole, o sangue é impulsionado para frente, para o interior das artérias.

O sangue flui normalmente de maneira contínua, das grandes veias para as aurículas, e em geral, cerca de 70% deste sangue fluem direto para os ventrículos, antes mesmo da contração das aurículas. A contração auricular é responsável em 30% do enchimento adicional. Contudo, as aurículas podem se tornar de todo não-funcionantes, como resultado da fibrilação auricular ou de bloqueio cardíaco, e, ainda assim, os ventrículos operarão quase de maneira normal; os ventrículos têm a capacidade de bombear cerca de 300% a 400% a mais de sangue, do que o fluxo basal da circulação sistêmica. Por isso, quando a circulação se opera de modo normal, é com dificuldade que se pode perceber a falta da função auricular, por causa da grande capacidade de reserva dos ventrículos. Ainda assim, quando o coração está sob uma sobrecarga muito grande, tal como durante o exercício, a presença do bombeamento auricular pode significar um aumento de 30% a 40% no débito cardíaco máximo, que é a quantidade de sangue lançada pelo ventrículo esquerdo na aorta.

Ao final da sístole, grande quantidade de sangue se acumulou nas aurículas. Em consequência, as pressões auriculares estão elevadas. Daí, imediatamente, após o final da sístole, as pressões ventriculares caem a valores diastólicos inferiores as altas pressões nas aurículas e, como resultado, as válvulas A-V (atrioventriculares), se abrem para que o sangue flua rapidamente aos ventrículos. As pressões auriculares caem até uma fração de milímetro das pressões ventriculares, desde que a válvulas A-V normais são tão grandes, que não oferecem resistência ao fluxo sanguíneo.

#### **4.2.3 Período de contração isométrica**

Logo após o início da contração ventricular, a pressão dos ventrículos começa a subir. O aumento instantâneo da pressão faz com que as válvulas A-V se fechem, mas necessita de um adicional de 0,02 segundos a 0,03 segundos, para que os ventrículos desenvolvam suficiente pressão, para abrir as válvulas semilunares aórticas e pulmonares, contra as pressões na aorta e na artéria pulmonar. Por isso, durante esse período de tempo, a contração está ocorrendo nos ventrículos, mas sem que haja esvaziamento; esse período é denominado contração isométrica, significando que a tensão está aumentando no músculo, mas sem encurtamento das fibras musculares.

Quando a pressão aórtica sobe um pouco acima de 80 mmHg, e a pressão na artéria pulmonar, um pouco acima de 8 mmHg, que representa pressões diastólicas na aorta e na artéria pulmonar, respectivamente, as pressões ventriculares determinarão a abertura das válvulas semilunares. Em seguida, o sangue começa a fluir para fora dos ventrículos, ocorrendo cerca da metade do esvaziamento, durante o primeiro quarto da sístole, e a maior parte da outra metade, durante os próximos dois quartos. Os três quartos da sístole são denominados período de ejeção.

#### **4.2.4 Período de relaxamento isométrico**

Ao final da sístole, o relaxamento ventricular subitamente começa permitindo que a pressão intraventricular diminua rapidamente. As pressões elevadas nas grandes artérias empurram o sangue imediatamente para trás, na direção dos ventrículos, o que determina o fechamento das válvulas aórtica e pulmonar. Por outros 0,03 segundos a 0,06 segundos, o músculo ventricular continua a relaxar-se, e as pressões intraventriculares diminuem rapidamente, de volta aos seus valores diastólicos baixos. Com a queda das pressões ventriculares abaixo das auriculares, as válvulas A-V se abrem, e se inicia um novo ciclo ventricular.

#### **4.2.5 Débito de trabalho cardíaco**

O débito cardíaco é a quantidade de sangue lançada pelo ventrículo esquerdo na aorta, a cada minuto. O termo retorno venoso é empregado para indicar a quantidade de sangue que flui, por minuto, das veias para a aurícula direita. Quando o débito cardíaco é maior que o retorno venoso, o volume do sangue nos pulmões e no coração diminui, ao passo que aumenta na circulação sistêmica. Valor normal de débito cardíaco, em um adulto masculino jovem e sadio, é de 5,6 litros por minuto; sendo cerca de 10% menor na mulher de mesma estatura. Experiências demonstram que, o débito cardíaco aumenta em proporção a superfície corporal. Assim, costuma-se estabelecer o débito em termos de índice cardíaco, que representa o débito cardíaco por metro quadrado de superfície corporal.

Então, débito cardíaco é a quantidade de sangue expulsa pelo coração por minuto, e, é igual ao volume sistólico multiplicado pelo número de batimentos por minuto. Essa fórmula mostra que, o volume sistólico deve diminuir, se a frequência cardíaca aumenta, enquanto o débito cardíaco permanece constante. Ao contrário, um decréscimo na frequência cardíaca deve ser compensado por um aumento no volume sistólico.

O débito de trabalho cardíaco é a quantidade de energia que o coração transfere para o sangue, enquanto o bombeia para as artérias. A energia é transferida para o sangue em duas formas; primeiro, utiliza-se a maior proporção, a fim de mover o sangue do sistema venoso de baixa

pressão para as artérias de alta pressão, isto é, a energia potencial de pressão; segundo, uma proporção menor de energia é utilizada para acelerar o sangue a sua velocidade de ejeção, através da válvula aórtica e pulmonar, e é denominada energia cinética do fluxo sanguíneo.

O trabalho executado pelo ventrículo esquerdo para elevar a pressão sanguínea durante cada batimento cardíaco é igual ao volume sistólico multiplicado à pressão média de ejeção do ventrículo esquerdo, menos a pressão da aurícula esquerda. Do mesmo modo o trabalho executado pelo ventrículo direito, para elevar a pressão sanguínea durante cada batimento cardíaco, é igual ao volume sistólico multiplicado pela pressão média de ejeção do ventrículo direito, menos a pressão da aurícula direita.

Quando a pressão é expressa em *dinas por centímetro cúbico*, e o volume sistólico em *militros*, o débito de trabalho é expresso em *ergs* e um *erg* equivale a  $10^{-7}$  *joules*. Em geral, o débito de trabalho do ventrículo direito é cerca de 1/7 do débito do ventrículo esquerdo, devido à diferença da pressão sistólica, contra os quais ambos os ventrículos devem bombear.

Enquanto que, o débito de trabalho de cada ventrículo, necessário para criar energia cinética do fluxo sanguíneo, é proporcional a massa de sangue expulsa, multiplicado pelo quadrado da velocidade de ejeção.

Sendo que a energia cinética,  $E$ , é representada por  $mv^2/2$ , quando a massa ( $m$ ) é expressa em *gramas* de sangue ejetado, a velocidade ( $v$ ) em *centímetros por segundo* e o débito de trabalho é em *ergs*.

Quase sempre o débito de trabalho do ventrículo esquerdo, necessário para criar energia cinética do fluxo sanguíneo, é de 2% a 4% do débito total de trabalho do ventrículo. A maior parte desta energia é utilizada para provocar a rápida aceleração do sangue, durante o primeiro quarto da sístole. Em certas condições anormais, tais como, na estenose aórtica, na qual o fluxo sanguíneo ocorre com grande velocidade, através de uma válvula estenosada, uns 50% do débito total de trabalho podem ser necessários, para criar energia cinética de fluxo sanguíneo.

#### **4.2.6 Energia para a contração cardíaca**

O músculo cardíaco, como o músculo esquelético, utiliza a energia química para prover o trabalho de contração. Esta energia é derivada, sobretudo, do metabolismo da glicose com oxigênio.

A quantidade de energia despendida pelo coração está em relação a sua carga de trabalho, da seguinte maneira: a energia despendida é diretamente proporcional ao grau de tensão gerada pela musculatura cardíaca, durante a contração, multiplicada pelo tempo em que a tensão é mantida.

Durante a contração muscular, a maior parte da energia química é convertida em calor, e uma pequena porção em trabalho. A relação do débito de trabalho com dispêndio de energia química é chamado de eficiência da musculatura cardíaca ou eficiência do coração. A eficiência normal, que trabalha com carga normal, costuma ser baixa, de uns 5% a 10%. Contudo, durante o débito máximo de trabalho, ela pode chegar a 15% ou 20% no coração normal, e talvez a 25% no coração de uma atleta bem treinado.

A diminuição da capacidade de bombeamento cardíaco, produzida por lesão cardíaca de qualquer natureza, baixa a curva de função cardíaca, o que, por sua vez, reduz o débito cardíaco.

#### **4.3 Cardiologia Nuclear e patologias associadas**

A era da imagem cintilográfica cardíaca não invasiva em humanos começou no início da década de 1970, com os primeiros relatos de avaliação não invasiva do fluxo sanguíneo miocárdico em repouso. Desde essa época, ocorreram grandes avanços na capacidade técnica de visualizar a fisiologia e a fisiopatologia cardíacas, inclusive o fluxo sanguíneo miocárdico, o metabolismo miocárdico e função ventricular (UDELSO et al., 2010).

A cardiologia nuclear desempenha um papel definitivamente estabelecido na avaliação diagnóstica, funcional e prognóstica dos pacientes com suspeita ou sabidamente portadores de cardiopatias isquêmicas. No âmbito da Síndrome Isquêmica Miocárdica Instável - SIMI, a cintilografia miocárdica de perfusão desponta como um instrumento importante na estimativa do significado funcional das estenoses coronarianas angiográficas, na avaliação da eficácia de intervenções terapêuticas, e na estratificação do risco após o infarto do miocárdio. Contudo, a capacidade da cardiologia nuclear em prever a ocorrência de fenômenos agudos como fissura e/ou ruptura da placa aterosclerótica com trombose é ainda limitada, embora venha sendo alvo de novas e intensas pesquisas (WOODS et al., 2005).

Estudos demonstram que o indivíduo com um exame de cintilografia miocárdica em repouso considerada de baixo risco, determina também, baixo risco de eventos cardíacos subsequentes (WOODS et al., 2005).

Em coronariopatas, a cintilografia é importante na estratificação de risco e avaliação prognóstica de pacientes com angina estável, e conseqüentemente no auxílio da decisão terapêutica entre clínica, e/ou cirúrgica. Em pacientes com coronariopatia obstrutiva conhecida, a cintilografia é importante na avaliação da repercussão isquêmica de lesão limítrofe que representa 30% a 60% de obstrução pela coronariografia (SAHA, 1998).

Essa técnica também é indicada para estratificação de risco pós - infarto agudo do miocárdio - IAM, angina instável e na estratificação de risco para pacientes que vão se submeter a cirurgias não cardíacas, em especial vasculares; avaliação de isquemia após procedimento de revascularização miocárdica ou angioplastia - detecção de reestenose ou complicações; detecção da presença de viabilidade miocárdica em pacientes com miocardiopatia isquêmica com disfunção ventricular; diagnóstico precoce de isquemia em unidades de dor torácica; avaliação de isquemia na população pediátrica nos casos de anomalia coronariana congênita e doença de Kawasaki (SAHA, 1998).

O diagnóstico de dor torácica de origem cardíaca, em serviços de emergência ou mesmo no ambulatório, é de difícil identificação na maioria das vezes. Esta dificuldade diagnóstica acarreta na liberação inadequada de pacientes portadores de Síndrome Isquêmica Miocárdica

Instável - SIMI, gerando risco a vida do paciente e problemas médico-legais ao hospital. (AZEVEDO et al., 2007, MENEGHETTI, 2007).

Na insuficiência cardíaca, para avaliação da função do ventrículo esquerdo, a cintilografia auxilia na identificação de áreas viáveis do músculo cardíaco e no acompanhamento de pacientes que recebem quimioterapia com doxorubicina, um fármaco cardiotóxico. Além de ter indicação após transplantes cardíacos e doenças das válvulas do coração para avaliar a função cardíaca (CHALELA, MENEGHETTI, 2005).

Em pesquisas realizadas no Instituto do coração, do Hospital das clínicas de São Paulo, com o objetivo de analisar e quantificar a isquemia miocárdica prévia e a seis meses da revascularização cirúrgica do miocárdio - RCM e da revascularização por angioplastia transluminal coronariana - ATC, foi possível avaliar o real benefício da revascularização completa do miocárdio, através de parâmetros fornecidos e identificação da variação no grau da carga isquêmica miocárdica determinada pelos dois tipos de revascularização em situações equivalentes, com o auxílio do acompanhamento clínico e do exame de cintilografia do miocárdio com  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi. (MOREIRA, et al., 2005)

#### **4.3.1 Radiofármacos mais utilizados em exames cardíacos**

Os radiofármacos são compostos radioativos usados para diagnósticos e tratamento terapêutico de doenças. Em medicina nuclear, aproximadamente 95% dos radiofármacos são usados para diagnóstico e o restante para tratamento. Por serem administrados a seres humanos, eles devem ser esterilizados, livre de agentes pirogênicos e submetidos a todas as medidas necessárias de controle de qualidade de uma droga convencional (SAHA, 1998).

O radiofármaco pode ser um elemento radioativo como o  $^{133}\text{Xe}$ , ou um composto marcado como  $^{131}\text{I}$  - proteínas iodadas e compostos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ . O radiofármaco é composto por dois componentes, um radionuclídeo e um fármaco. A sua utilidade é ditada pelas características dos seus componentes. Em sua concepção o fármaco é escolhido com base em sua localização preferencial no órgão e sua participação na função fisiológica do órgão (COSTA et al., 2001).

#### 4.3.1.1 Tálcio 201 – $^{201}\text{Tl}$

Produzido em ciclotron, o  $^{201}\text{Tl}$  tem meia-vida física de 74 horas, emitindo em seu processo de decaimento, predominantemente, radiação X na faixa energética de 69 keV a 83 keV, além de uma intensidade menor de radiação gama, com 166 keV e 135 keV. Como um traçador de fluxo, uma vez injetado por via venosa, o cloreto de  $^{201}\text{Tl}$  distribui-se por quase todos os tecidos do corpo, à exceção do cérebro, devido à sua incapacidade de transpor a barreira hematoencefálica, proporcionalmente ao fluxo sanguíneo regional, acumulando-se principalmente no miocárdio, rins, fígado, intestinos e musculatura esquelética. Ao ser administrado a um indivíduo em repouso, a captação miocárdica do  $^{201}\text{Tl}$  é rápida, com cerca de 90% da extração ocorrendo na primeira passagem. Essa captação utiliza mecanismos de transporte ativo com utilização de energia pela bomba de sódio-potássio e difusão passiva dependente do gradiente do potencial elétrico transmembrana. Quando comparado aos agentes marcados com tecnécio-99m, a extração miocárdica do  $^{201}\text{Tl}$  correlaciona-se de forma mais linear com o aumento do fluxo coronariano, mantendo-se assim até que esse fluxo alcance duas vezes e meia o valor basal (MENEGHETTI, CHALELA, 2006).

Uma característica marcante do  $^{201}\text{Tl}$  é a sua capacidade de redistribuição, também denominada de fenômeno da redistribuição. Essa propriedade torna possível avaliar as alterações de fluxo induzidas pelo estresse físico ou farmacológico, com imagens obtidas imediatamente após a administração do agente nesta etapa, e compará-las às imagens obtidas algumas horas depois, em média 4 horas. Em consequência da redistribuição ocorrida durante esse período de repouso, as áreas hipoperfundidas durante a etapa do estresse tenderão à normalização em relação às áreas normoperfundidas, uma vez que, em condições de repouso as alterações do fluxo coronariano tendem a ser menores que sob-estresse. Essa transitoriedade do defeito de perfusão observado no estresse em relação ao repouso em geral é interpretada como indicativa de isquemia, enquanto que a persistência da hipocaptação em um determinado segmento pode traduzir fibrose ou miocárdio hibernante ou atordado (MENEGHETTI, CHALELA, 2006).

Diante de tais possibilidades, muitas vezes faz-se necessária uma dose adicional do radiotraçador ou reinjeção, habitualmente logo após as imagens de redistribuição, para a

caracterização de miocárdio viável. Tradicionalmente utilizado em estudos de perfusão miocárdica, tem sido recentemente menos empregado em consequência do seu perfil energético menos favorável e da meia-vida física longa que limita a dose utilizada, com vantagens para os agentes marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ . No entanto, ainda é empregado na cardiopatia isquêmica em função da grande experiência acumulada, sendo, em alguns centros, o agente de escolha (MENEGHETTI, CHALELA, 2006).

Após a injeção no pico do exercício, o cloreto de  $^{201}\text{Tl}$  acumula-se rapidamente no miocárdio irrigado por artérias coronárias normais e, subseqüentemente, sofre um lento clareamento. Em pacientes normais, após 2h da injeção, ocorre um clareamento de, aproximadamente 30%, e após 4h, de 35%. A taxa de clareamento do  $^{201}\text{Tl}$  está relacionada com a frequência cardíaca no pico do exercício, duração do exercício e o nível sérico, ou concentração presente no sangue. A cinética no miocárdio isquêmico é variável. Em caso de estenose da artéria coronária significativa, a captação inicial do  $^{201}\text{Tl}$  durante o exercício é menor quando comparada com a do miocárdio normal. Logo depois, o clareamento nos tecidos isquêmicos é menor que o normal, pode ocorrer sua acumulação no decorrer do tempo. Assim, um defeito perfusional isquêmico normaliza-se ou acentua após determinado tempo. A captação inicial do  $^{201}\text{Tl}$  no miocárdio infartado ou fibrótico é consideravelmente menor que no miocárdio normal (NICOLAU et al., 2014).

#### 4.3.1.2 Tecnécio 99 metaestável – $^{99m}\text{Tc}$

O processo de emissão de raios gama devido à transição isomérica, onde um núcleo no estado excitado passa ao estado fundamental, é de importância primordial para a medicina nuclear, uma vez que a maioria dos procedimentos realizados depende somente da emissão e detecção de radiação gama. A figura 9 mostra o esquema de decaimento do  $^{99m}\text{Tc}$ .

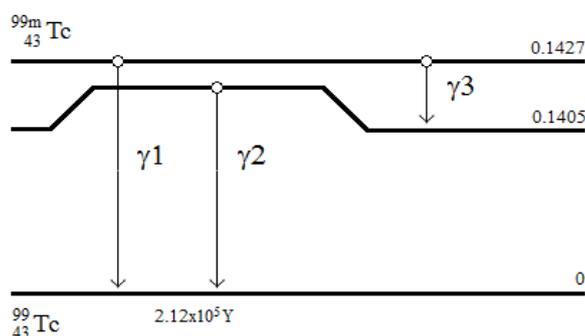


Figura 5. Esquema do decaimento principal do tecnécio-99m.

Fonte: BUSHBERG, 2002, p. 601

Existem três transições com emissão de raios-gama no decaimento do  $^{99m}\text{Tc}$  para o  $^{99}\text{Tc}$ . Praticamente toda a energia da transição gama 1 ( $\gamma_1$ ) é convertida internamente resultando na emissão de elétrons de conversão interna da camada M. Após a conversão interna, o núcleo é deixado em um estado excitado, seguido quase instantaneamente pela transição gama 2 ( $\gamma_2$ ) de 140,5 KeV para o estado fundamental. Embora a transição  $\gamma_2$  ocorra 98,6% das vezes, a tabela de decaimento mostra que esse raio gama é emitido 87,87% do tempo, com o balanço das transições ocorrendo via conversão interna. Gama 2 é o fóton principal no imageamento em medicina nuclear. A transição gama 3 ( $\gamma_3$ ) ocorre apenas com 1,4% de incidência e, é seguida, quase sempre, por emissão de elétrons de conversão interna. Elétrons de conversão, raios X característicos e elétrons Auger são também emitidos à medida que a energia de algumas transições é internamente convertida (BUSHBERG et al., 2002).

A Tabela 1 identifica as principais formas de decaimento de  $^{99m}\text{Tc}$ , com tipo de radiação, número médio por desintegração e energia média por partícula em MeV.

Tabela1. Principais formas de decaimento do tecnécio-99m.

Radiação	nº médio por desintegração	energia média por partícula (MeV)
Gama 1	0,0000	0,0021
M e <sup>-</sup> Cl	0,9860	0,0016
Gama 2	0,8787	0,1405
K e <sup>-</sup> Cl	0,0913	0,1194
L e <sup>-</sup> Cl	0,0118	0,1377
M e <sup>-</sup> Cl	0,0039	0,1400
Gama 3	0,0003	0,1426
K e <sup>-</sup> Cl	0,0088	0,1215
L e <sup>-</sup> Cl	0,0035	0,1398
M e <sup>-</sup> Cl <sup>-</sup>	0,0011	0,1422
K α-1 Raios-X	0,0441	0,0183
K α-2 Raios-X	0,0221	0,0182
K β-1 Raios-X	0,0105	0,0206
KLL e <sup>-</sup> Auger	0,0152	0,0154
KLX e <sup>-</sup> Auger	0,0055	0,0178
LMM e <sup>-</sup> Auger	0,1093	0,0019
MXV e <sup>-</sup> Auger	1,2359	0,0004

Fonte: Modificado de BUSHBERG, 2002.

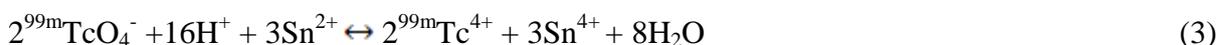
O tecnécio pode ser encontrado em oito estados de oxidação (-1 a +7). A estabilidade desses estados de transição depende do tipo de ligação e do ambiente químico. Os estados +7 e +4 são mais estáveis e são representados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos (JUN HO et al., 2006 ).

O íon pertecnetato,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , obtido da eluição do gerador Mo/Tc, tem estado de oxidação +7 para o  $^{99m}\text{Tc}$ . Isso o torna uma espécie não reativa e incapaz de se ligar a algum composto, sendo necessária a redução para um estado de oxidação menor.

O cloreto de estanho II ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) é o agente redutor mais comum usado na preparação de compostos ligados ao  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (NOWOTNIK, 1990; SAHA, 2004). As reações químicas que ocorrem na redução do tecnécio pelo cloreto estanoso em meio ácido podem ser expressas da seguinte maneira:



Somando as duas equações:



A Equação 2 indica que o  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{7+}$  foi reduzido para o  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{4+}$ . Outros estados reduzidos poderão ser formados em diferentes condições físico-químicas. O grau de redução dependerá da relação estequiométrica entre o estanho e o tecnécio; das condições em que se realiza a reação; da presença de um ligante; da natureza química do ligante e oxigênio presente em solução (ARAÚJO, 2005).

O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  reduzido é uma espécie quimicamente reativa e combina com uma grande variedade de agentes quelantes por meio de uma ligação covalente coordenada, possibilitando formar diversos radiofármacos. A estrutura e as propriedades químicas do agente quelante são responsáveis pela farmacocinética do composto, ou seja, localização em um órgão alvo, metabolização e eliminação do organismo (SAHA, 1998).

Uma reação esquemática seria:



O agente quelante geralmente doa pares de elétrons para formar ligações covalentes coordenadas com o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  reduzido. Grupos químicos, tais como  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{SH}$  são os doadores de elétrons nos compostos (SAHA, 2004).

Mais de 80% dos radiofármacos utilizados na medicina nuclear são compostos marcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . A razão de sua posição notável, em uso clínico, é a sua condição física e radiação características favoráveis. A meia-vida física de aproximadamente 6 horas e a pequena

quantidade de emissão de elétrons permitem a administração de quantidades de  $^{99m}\text{Tc}$  com atividade na ordem de grandeza de milicurie, sem deposição significativas de doses de radiação para o paciente. Além disso, os fótons monocromáticos de 140,5 keV de energia são prontamente colimados para fornecer imagens de resolução espacial superior. O  $^{99m}\text{Tc}$  é facilmente disponível de forma estéril, apirogênica, e livre de carreador no gerador  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  (SAHA, 1998).

#### 4.3.1.3 Flúor 18 – Fluorodeoxyglucose (FDG)

Em 1996, o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, localizado no Campus da Universidade de São Paulo, realizou a primeira produção de 2-Flúor-2dioxi-D-Glicose, um análogo da glicose também conhecido como  $^{18}\text{F}$ -FDG, no Ciclotron. Naquela época, a produção de gálio-67 e tálio-201 ocorriam rotineiramente na instalação, porém no mundo afora, especialmente nos Estados Unidos, o uso clínico do  $^{18}\text{F}$ -FDG começava a ganhar reconhecimento com promessas inovadoras no diagnóstico através do equipamento conhecido como PET - *Positrón Emission Tomography*. O  $^{18}\text{F}$ -FDG é o radiofármaco com maior crescimento nos últimos anos no IPEN, e esse crescimento é decorrente dos investimentos para aquisição dos equipamentos PET/CT pelos hospitais, seguindo uma tendência mundial da área de diagnóstico através da imagem molecular (SATO, 2006).

A identificação de viabilidade em áreas de miocárdio disfuncionante reveste-se de grande importância pelo potencial de recuperação funcional em resposta a procedimentos de revascularização e melhora do prognóstico. A FDG é uma molécula análoga da glicose, marcada com flúor-18, um emissor de pósitrons com meia-vida física de 110 minutos. A FDG tem como principal aplicação na cardiologia à pesquisa de viabilidade miocárdica (MENEGHETTI, CHALELA, 2006).

A FDG- $^{18}\text{F}$ , após atravessar a membrana do cardiomiócito, sofre processo de fosforilação transformando-se em FDG- $^{18}\text{F}$ -6-fosfato. Entretanto, de forma diferente da glicose, esse análogo não sofre a subsequente desfosforilação e, por ser impermeável à membrana celular, fica virtualmente retida no miocárdio. As imagens de FDG- $^{18}\text{F}$  podem ser obtidas utilizando-

se câmaras de cintilação SPECT, especialmente adaptadas para a realização de estudos com emissores de pósitrons. Essa adaptação pode consistir em dotar a câmara de um sistema de coincidência, câmaras híbridas, ou equipá-las com colimadores adequados à energia característica dos pósitrons emitidos pelo flúor-18 que é de 511 keV. O ideal, entretanto, é utilizarem-se câmaras PET dedicadas. O racional da utilização da FDG-<sup>18</sup>F baseia-se no fato de que o miocárdio acentuadamente isquêmico utiliza predominantemente a glicose como substrato energético. Classicamente, na pesquisa de viabilidade miocárdica, as imagens obtidas após a administração de FDG-<sup>18</sup>F, que, portanto, refletem a presença de atividade metabólica miocárdica, são comparadas com imagens obtidas utilizando-se marcadores perfusionais, sejam eles emissores de pósitrons ou de fóton único. Como resultado, pode-se obter uma das seguintes combinações: perfusão normal e captação normal da FDG-<sup>18</sup>F; perfusão reduzida e captação da FDG-<sup>18</sup>F normal ou aumentada; perfusão reduzida e captação de FDG-<sup>18</sup>F reduzida. Os dois primeiros padrões são característicos de áreas de miocárdio viável e com possibilidade de melhora funcional. A terceira combinação reflete ausência de viabilidade miocárdica e disfunção persistente ou irreversível (MENEGETTI, CHALELA, 2002).

O miocárdio utiliza, durante a maior parte do tempo, ácidos graxos livres, como sua principal fonte de energia na produção de ATP. Em situações especiais, em que o substrato carboidrato torna-se abundante, os níveis de insulina endógena do paciente elevam-se, promovendo diminuição da lipólise e aumento no fluxo de glicose para o espaço intracelular, inclusive no miócito cardíaco, facilitando a utilização de glicose como substrato energético, o que ocorre, por exemplo, em período pós prandial, ou jejum. Outra situação em que o miocárdio utiliza preferencialmente a glicose é a de isquemia crônica do miocárdio, em que a oferta de oxigênio é baixa e o coração pode usar o início da via glicolítica, anaeróbica, para a produção de ATP. Sendo o FDG um carboidrato, análogo da glicose, a captação deste traçador ocorre da mesma forma em que ocorre, fisiologicamente, a captação de glicose. Na pesquisa de miocárdio hibernante, quando 18-FDG é injetado em jejum, poderá ser observado um acúmulo do traçador nas áreas de isquemia crônica (MENEGETTI, CHALELA, 2002).

Outra forma de estimular a captação deste traçador é fornecer glicose ao paciente, por via oral ou endovenosa, fazendo com que o miocárdio, como um todo, isquêmico e não isquêmico utilize a glicose e permita a captação do FDG (MENEGETTI, CHALELA, 2002).

No protocolo oral, uma dose de 50 g de glicose é administrada por via oral. A glicemia do paciente é monitorada em intervalos de 15 min. Espera-se obter um pico de glicemia em torno de 175 mg/dL – 200 mg/dL. Continua-se o monitoramento até que seja observado um declínio nos níveis de glicemia, representando a liberação e a ação de insulina endógena do paciente. O FDG, em dose de 185 – 370 MBq (5mCi - 10 mCi), é injetado quando a glicemia atinge níveis descendentes em torno de 120-130 mg/dl. A dose de 185 MBq (5 mCi) normalmente é usada em câmaras híbridas que utilizam circuitos de coincidência (sem colimadores) e com alta sensibilidade na contagem. Dose mais elevada, 370 MBq (10 mCi), pode ser utilizada em sistemas que envolvam a presença de colimador de ultra alta energia, devido à diminuição na sensibilidade, contagem promovida por estes colimadores (MENEGHETTI, CHALELA, 2002).

O protocolo endovenoso, clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado padrão ouro para a mensuração de sensibilidade à insulina *in vivo* é aplicado. Quantidades de glicose e insulina são administradas via endovenosa, mantendo-se um nível alto de insulina circulante e suficiente para manter o paciente euglicêmico durante o estudo. A monitorização frequente da glicemia é essencial pela possibilidade de hipoglicemia durante a infusão da solução. Utilizando-se este protocolo, o FDG pode ser injetado 20 min após o início da infusão, a qual deve ser mantida por 30 min para que ocorra uma captação adequada do traçador pelo miocárdio. O nível alto de insulina, administrada de forma exógena, facilita o transporte do FDG para o espaço intracelular. As melhores imagens miocárdicas têm sido obtidas com a utilização deste protocolo endovenoso. Pacientes diabéticos podem necessitar de doses maiores de insulina e em alguns casos as imagens podem ter qualidade inferior (MENEGHETTI, CHALELA, 2002).

Os parâmetros de aquisição das imagens dependerão do tipo de sistema utilizado, envolvendo ou não colimador ou circuito de coincidência. A janela de energia deve ser centrada no fotopico do flúor-18, que é de 511 KeV. Conforme já mencionado, os sistemas que utilizam colimadores permitem a realização de protocolos que possibilitam a aquisição simultânea de imagens de perfusão, usando  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi e imagens metabólicas do FDG, simultaneamente, detectando tanto o fotopico do  $^{99m}\text{Tc}$  de 140 keV, quanto o do flúor-18 de 511 keV (MENEGHETTI, CHALELA, 2006).

O maior uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG tem sido para o diagnóstico oncológico nos equipamentos do tipo PET e PET/CT. Essa utilização deverá crescer nos próximos anos, podendo se expandir para outras especialidades como neurologia e cardiologia (SATO, 2006).

O uso do flúor-18 como FDG - fluorodeoxyglucose para imagem com tomografia computadorizada de emissão de fóton único, tem sido introduzido recentemente, para avaliar viabilidade miocárdica. Já existem centros com experiência em exames utilizando FDG – SPECT. Bax et al.(1997), comparou FDG–SPECT com FDG-PET e demonstraram concordância entre eles.

#### **4.3.2 Fármacos associados ao tecnécio-99m em cintilografia de perfusão do miocárdio**

Vários compostos marcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  têm sido desenvolvidos para cintilografia miocárdica. No momento, tanto o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi quanto o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin são amplamente utilizados. O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é um isótopo radioativo que emite radiações gama na faixa de 140 keV e possui meia-vida física de 6h. Por causa da depuração lenta, a meia-vida biológica do sestamibi, bem como a do tetrafosmin, é aproximadamente semelhante à sua meia-vida física. A dose absorvida de corpo total para esses agentes é de aproximadamente  $5,4054 \times 10^{-12}$  Gy/MBq. O órgão-alvo é a bexiga, que recebe aproximadamente  $4,8648 \times 10^{-11}$  Gy/MBq (NICOLAU et al., 2014).

Durante as três primeiras horas após a injeção, aproximadamente 30% de um agente marcado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é depurado do coração. Embora a redistribuição do sestamibi em defeitos isquêmicos tenha sido demonstrada em modelos animais e em pacientes selecionados, o grau de redistribuição em humanos é mínimo e não tem significado clínico. Uma vez que a distribuição miocárdica se mantém relativamente fixa no decorrer do tempo, a distribuição do fluxo sanguíneo miocárdico no momento da injeção é congelada e pode ser estudada durante várias horas. Sendo necessárias duas injeções para avaliar a captação miocárdica, uma em repouso e outra em exercício (NICOLAU et al., 2014).

Como à dosimetria dos compostos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  é mais favorável em relação ao  $^{201}\text{Tl}$ , doses maiores que 30 mCi por dia podem ser administradas. A distribuição inicial dos compostos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  no miocárdio é proporcional ao fluxo regional. Após a injeção, o radiofármaco acumula-se também rapidamente no fígado e é subsequentemente depurado pelo sistema biliar. A fração de extração miocárdica do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é de 41% e a do  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrafosmin é de 30%, sendo ambas substancialmente menores que a do  $^{201}\text{Tl}$ . Ambos os agentes entram no miócito por difusão passiva ligando-se de forma estável às membranas intracelulares. A retenção absoluta dos agentes marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ , verificado vários minutos após a administração, é relativamente comparável à do  $^{201}\text{Tl}$ , devido à sua retenção intracelular, e à subsequente captação durante a recirculação (NICOLAU et al., 2014).

O tecnécio-99m é o radioisótopo que reúne as melhores características físicas para a obtenção de imagens em câmaras Anger - câmaras de cintilação. Pode estar prontamente disponível, de forma conveniente, através de um gerador de molibdênio-99 a um custo reduzido. Eluído do gerador sob a forma de pertecnetato -  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , a sua utilização direta restringe-se aos estudos de primeira passagem, uma vez que, administrado por via venosa, rapidamente se difunde através das membranas capilares para o espaço intersticial. Entretanto, o pertecnetato -  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  pode ser utilizado para marcar uma grande variedade de moléculas com o objetivo de obter imagens das mais diversas estruturas ou órgãos, o que lhe confere um papel de destaque na medicina nuclear. Especificamente em cardiologia, sempre houve grande interesse no desenvolvimento de agentes marcados com tecnécio-99m para o estudo da perfusão miocárdica (MENEGHETTI; CHALELA, 2006).

#### **4.3.2.1 Sestamibi ou MIBI**

Desenvolvido em 1982, este cátion lipofílico do grupo das isonitrilas é o agente marcado com tecnécio-99m, mais amplamente utilizado nos estudos de perfusão miocárdica. Uma vez administrado por via venosa, o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é captado pelo miócito em processo de difusão passiva dependente do potencial elétrico transmembrana, concentrando-se predominantemente nas mitocôndrias. A taxa de extração miocárdica do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é de

55%-60% na primeira passagem pelo órgão, contra 85% do tálio-201, sendo que sua extração não aumenta linearmente com o aumento do fluxo coronariano, ocorrendo um platô quando esse fluxo atinge entre dois a 2,5 mL.g.min<sup>-1</sup>. Em condições normais, a captação pulmonar é mínima, não interferindo na imagem. MIBI apresenta pequena redistribuição, com *washout* ou eliminação de 27% nas áreas normais e 16% nas áreas isquêmicas. É excretado pelo sistema hepatobiliar e, por esta razão, a concentração hepática é alta logo após a sua administração. Geralmente, não é possível diferenciar entre infartos recentes ou antigos nem diferenciar infarto do miocárdio recente de casos de isquemia (MENEGHETTI; CHALELA, 2006).

Esta medicação é administrada através de injeção intravenosa para uso diagnóstico, após reconstituição obtida com solução de <sup>99m</sup>Tc-pertecnetato de sódio estéril, apirogênica e livre de oxidantes. O pH do produto reconstituído é 5,5 (5,0 – 6,0). Não há presença de conservantes. A estrutura exata do complexo de tecnécio é <sup>99m</sup>Tc[MIBI]<sup>6+</sup>, onde MIBI é 2-metoxi-isobutil-isonitrila (MENEGHETTI; CHALELA, 2006).

#### **4.3.2.2 Tetrofosmin**

Embora pertencente a outro grupo de fármacos, o das difosfinas, o tetrofosmin também é um cátion lipofílico que, quando marcado com tecnécio-99m, apresenta características farmacocinéticas semelhantes ao <sup>99m</sup>Tc-sestamibi, exceto pela excreção mais rápida através do sistema hepatobiliar, o que permite que sejam obtidas imagens mais precocemente, de 15min a 30 minutos após a sua administração contra 30min a 60 minutos do <sup>99m</sup>Tc-sestamibi. Outra diferença e, provavelmente, uma vantagem em relação ao <sup>99m</sup>Tc-sestamibi é que o processo de marcação do tetrofosmin pelo <sup>99m</sup>Tc, dispensa aquecimento (MENEGHETTI; CHALELA, 2006).

#### 4.3.2.3 Glucarato

Glucarato é um ácido dicarboxílico de seis carbonos usado para marcar miócitos necrosados, ligando a histonas nucleares ou nucleossoma. (CAMARGO, 2007)

Radiofármacos de gluconato, glucoptonato e o glucarato com tecnécio-99m, têm sido utilizados para detecção de tecidos hipoxiados em áreas de infarto do miocárdio e em tumores. Embora os compostos derivem dos carboidratos, estudos mostraram comportamento discrepante entre esses radiofármacos e o radiofármaco FDG-18, o qual é um análogo da glicose. Porém, existem hipóteses de que o <sup>99m</sup>Tc-glucarato se utiliza da via da frutose, por ser um análogo da mesma, e dentre seus análogos marcados, é o que tem se demonstrado com maior taxa de retenção no tecido tumoral (EVANGELISTA et al., 2012).

Johnson et al. (2000), investigaram e detectaram a captação do <sup>99m</sup>Tc-glucarato em região de risco do modelo de isquemia severa no suíno. Bioquímicos e biólogos tem mostrado que a glicose é um substrato de proteção para o coração quando o fluxo sanguíneo é limitado (GAMBHIR et al., 2001).

De acordo com a pesquisa de Murphy et al. (2002), com o objetivo de verificar a biodistribuição do tecnécio-99m-glucarato em ratos que tiveram seus corações induzidos quimicamente a um infarto agudo do miocárdio, por um fármaco que produziu aumento da frequência cardíaca, o isoproterenol; apresentou resultados histológicos demonstrando que os ratos desenvolveram infarto 18h após administração do isoproterenol. E o estudo da biodistribuição identificou rápido *clearance* ou depuração plasmática dos ratos, via função renal. Esse agente se mostrou ideal para detectar de forma rápida infarto cardíaco, devido à alta captação pelo coração do radiofármaco nos ratos infartados, seis vezes maior do que em ratos sem infarto.

Johnson III et al. (2006), através de estudos em cães, com resultados qualitativos e quantitativos, concluíram que o tecnécio-99m marcado com glucarato foi eficiente para detectar infarto agudo do miocárdio. Orlandi et al. (1991), verificaram utilidade clínica em imagens cardíacas bem como para diferenciar lesões antigas utilizando o tecnécio-99m

marcado com ácido glucárico, já que, atuou como marcador de necrose em modelos caninos de infarto agudo do miocárdio.

A captação de glicose e produção glicolítica de ATP, são importantes determinantes de viabilidade miocárdica, especialmente quando o coração está comprometido por baixo fluxo sanguíneo (KING et al., 1998). Ácidos graxos livres, glicose e lactato são fontes energéticas principais do coração. Os ácidos graxos tem importante papel no metabolismo do coração não isquêmico, enquanto que a glicose se torna o substrato principal para o miocárdio durante a isquemia (CAMICI et al., 1989; OPIE, 1976).

O coração usa predominantemente ácidos graxos em condições aeróbicas, mas depois de processar o carboidrato, a insulina produz efeito inibitório para a liberação dos ácidos graxos a partir de adipócitos, fazendo com que diminua a circulação desses e regulem a glicose utilizada pelo coração. Durante a isquemia, o metabolismo do ácido graxo é reduzido e a captação da glicose é aprimorada (BERGMANN, 1998).

O metabolismo normal, em relação ao fluxo sanguíneo, ou metabolismo aprimorado da glicose serve como sinal, assinatura metabólica da isquemia do miocárdio. Miocárdio com stress ou hibernante também demonstra oxigênio preservado, em relação à função e perfusão (CAMICI et al., 1989).

#### **4.3.2.4 1-tio-beta-D-glicose**

Para desenvolver um novo radiofármaco para diagnóstico de câncer ou inflamações, o grupo de pesquisa Núcleo de Radiações Ionizantes-NRI do Departamento de Engenharia Nuclear (DEN) da Escola de Engenharia – UFMG, marcou a glicose e/ou um de seus derivados com  $^{99m}\text{Tc}$ . Compostos de carboidrato como a glicose ligam-se fracamente ao  $^{99m}\text{Tc}$ . Portanto, a funcionalização com um grupo externo quelante ou a inserção de alguns grupos funcionais é essencial para obtenção de compostos fortemente ligados. O 1-Tio-beta-D-glicose (1-TG) é um análogo da beta-D-glicose natural. O 1-TG contém um átomo de enxofre em substituição ao oxigênio da ligação glicosídica, e provavelmente forma interações químicas e biológicas

diferentes com  $^{99m}\text{Tc}$ , comparado a glicose natural. A presença de um grupo sulfidril na molécula de glicose aumenta a eficiência de marcação e melhora a estabilidade do composto (JUN OH et al., 2006). A Figura 6 mostra a fórmula estrutural da D-glicose natural e do sal de sódio 1-tio- $\beta$ -D-glicose.

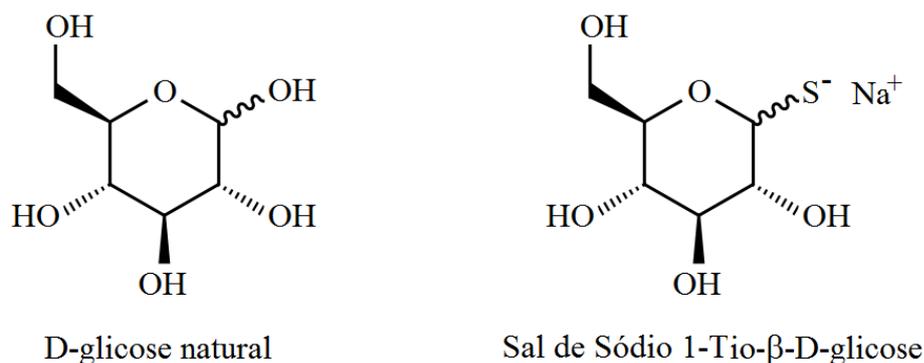


Figura 6. Fórmula estrutural da D-glicose natural e do sal de sódio 1-tio- $\beta$ -D-glicose  
Fonte: BRASILEIRO et al., 2010.

Sob diferentes concentrações do ligante,  $^{99m}\text{Tc}$ -1-TG foi obtido com uma eficiência de marcação superior a 97% e alta estabilidade em pH ácido comparados a pHs de valores neutros ou básicos (JUN OH et al., 2006). Brasileiro et al., (2010) encontrou 98,38% de eficiência de marcação. Também concluiu que o composto permaneceu estável por mais de 120 min. Essas pesquisas reforçam a viabilidade do uso desse fármaco para detecção de tumores, inflamações e doenças cardíacas justificam a importância do desenvolvimento de novos radiofármacos específicos pra estudos em SPECT.

Ainda no grupo de pesquisa NRI, Brasileiro et al. (2010), investigou a cintilográfica de processos inflamatórios na articulação temporomandibular por 1-tio-beta-D-glicose radiomarcado com  $^{99m}\text{Tc}$ . As desordens temporomandibulares representam um grupo de condições que acometem a articulação temporomandibular-ATM, os músculos mastigatórios e ligamentos associados, comumente relacionados a inflamações agudas e crônicas. Com o auxílio da medicina nuclear é possível visualizar estes processos inflamatórios em suas fases iniciais, por meio de imagens que captam o material radioativo correspondente às alterações teciduais funcionais, fisiológicas e/ou bioquímicas. Levando-se em consideração a premissa

de que há um aumento do metabolismo da glicose em processos inflamatórios, o estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade da detecção precoce de alterações inflamatórias na ATM, em modelo animal, por meio de imagens cintilográficas, empregando o 1-tio-beta-D-glicose (1-TG) radiomarcado com  $^{99m}\text{Tc}$ . O 1-TG sendo um análogo da glicose que contém um átomo de enxofre, permitiu a interação com o  $^{99m}\text{Tc}$ , possibilitando a formação de um radiofármaco promissor na avaliação de alterações inflamatórias. A metodologia consistiu na aplicação de um modelo experimental de indução de inflamação na ATM de ratos Wistar, através da injeção intra-articular de carragenina, um polissacarídeo linear sulfatado, na ATM esquerda dos animais. Para controle, na articulação contralateral foi injetado o mesmo volume de solução salina. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com as vias de administração do radiofármaco: via intravenosa e intraperitoneal. As imagens cintilográficas foram realizadas para localização do foco inflamatório, 24 horas após a indução da inflamação e trinta minutos após a injeção do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -1-TG. A captação do radiofármaco nas articulações foco e controle foram analisados pela determinação da atividade radioativa na região de interesse, em contagem por minuto (cpm). A análise estatística realizada utilizando-se o teste T e o teste não-paramétrico de Wilcoxon revelou que houve diferença, com significância estatística, dos valores de atividade, em cpm, relativos à articulação inflamada/foco quando comparados aos valores obtidos na articulação contralateral/controle em ambas as vias de administração. A investigação da cinética de distribuição do radiofármaco, por imagens, *in vivo*, realizada no grupo de injeção intravenosa do complexo radiomarcado evidenciou que o  $^{99m}\text{Tc}$ -1-TG apresenta captação e excreção renal com rápida eliminação do organismo. A análise cromatográfica mostrou um alto rendimento de marcação e uma estabilidade do radiofármaco por, no mínimo, duas horas após a síntese. Os resultados deste estudo demonstraram a viabilidade do emprego de  $^{99m}\text{Tc}$ -1-TG na localização precoce de focos de inflamação, abrindo uma perspectiva para a utilização deste radiofármaco na investigação de alterações inflamatórias que acometem a ATM.

Castro et al .(2012), no grupo de pesquisa NRI, em estudo da biodistribuição, *in vivo*, das impurezas radioquímicas  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ,  $^{99m}\text{TcO}_2$  e do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -1-tio-beta-D-glicose ( $^{99m}\text{Tc}$ -1-TG) em ratos da linhagem Wistar, investigou a dose absorvida nos órgãos do animal e a dose efetiva de corpo inteiro; com construção de um modelo computacional de *voxels* do rato, utilizado para simulação computacional da interação da radiação com o tecido. A

metodologia consistiu em modelar computacionalmente a biodistribuição das espécies, baseado nos dados biocinéticos adquiridos nas imagens cintilográficas de ratos Wistar. O código Monte Carlo N-Particle utilizou esse modelo para simular a interação da radiação com os tecidos e, o *software* SISCODES forneceu a dose absorvida em cada tecido de acordo com a biodistribuição do radiofármaco. A dose efetiva foi calculada conforme as recomendações da *International Commission Radiological Protection – ICRP (2007)*. Os resultados descreveram a biodistribuição dos compostos  $^{99m}\text{Tc-1-TG}$ ,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e  $^{99m}\text{TcO}_2$  por meio de imagens cintilográficas e curvas biocinéticas da porcentagem de atividade injetada em função do tempo de exame. Foram descritas, também, as etapas de construção do modelo de *voxels* e de obtenção dos parâmetros usados como fator de ponderação pelo programa SISCODES para estabelecer a energia depositada por massa em cada órgão ou tecido. Finalmente, os resultados apresentaram a dose efetiva e as doses absorvidas nos órgãos bexiga, cérebro, coração, estômago /trato gastrointestinal, fígado, gônadas, medula, osso, pulmões, rins e tireóide e, sua distribuição espacial, exibida em imagens axiais e coronais do modelo de *voxels* construído. Os valores encontrados da dose absorvida e dose efetiva no animal foram, então, extrapolados para o homem padrão, assumindo equivalência da biodistribuição. Para o complexo  $^{99m}\text{Tc-1-TG}$  a dose efetiva calculada foi  $8,4 \times 10^{-3}$  mSv/MBq. Uma administração típica de 370 MBq desse complexo, acarretaria em uma dose efetiva de 3,1 mSv para o homem padrão. Esse valor está abaixo do limite de 50 mSv estabelecido pela FDA (do inglês, *Food and drug Administration*) e, também abaixo da dose efetiva de 7,3 mSv calculada para o exame do radiofármaco  $^{18}\text{F-FDG}$ . Concluiu-se que a deposição de dose do  $^{99m}\text{Tc-1-tio-b-D-glicose}$  é inferior ou similar à de radiofármacos correntemente usados em centros de Medicina Nuclear e que o cálculo da dose interna pode ser realizado de forma confiável e precisa utilizando o sistema SISCODES, desenvolvido pelo grupo de pesquisa NRI.

### 4.3.3 Imagens cintilográficas

Várias técnicas imagiológicas têm sido desenvolvidas para detecção de miocárdio viável e não viável, tendo por base a avaliação da perfusão, da integridade da membrana celular, do metabolismo da glicose, da presença de tecido cicatricial e da reserva contráctil. A tomografia por emissão de pósitron - PET com fluorodeoxyglucose – FDG com flúor 18, a cintigrafia de

perfunção miocárdica com tálio  $^{201}\text{Tl}$  ou com tecnécio  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , dentre outros, o ecocardiograma com dobutamina e, mais recentemente, a ressonância magnética têm sido extensamente estudados na avaliação da viabilidade e na predição do resultado clínico após revascularização coronária. Em geral, as técnicas de imagem nuclear têm uma maior sensibilidade na detecção de viabilidade, enquanto, as técnicas que avaliam a reserva contrátil têm uma maior especificidade com menor sensibilidade (FERNANDES et al., 2011).

De acordo com Braunwald (2010), as diferentes técnicas aplicadas na aquisição e processamento de imagens em cardiologia nuclear já estão bem estabelecidas, fruto de um desenvolvimento progressivo ao longo das últimas três décadas. Os parâmetros, rotineiramente utilizados, para estudos de perfusão miocárdica e para avaliações da função ventricular, são semelhantes em todos os laboratórios nucleares.

#### **4.3.3.1 Tomografia computadorizada por emissão de fóton único - SPECT**

Em exames para avaliação da perfusão miocárdica, uma das técnicas utilizadas é a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT, do inglês *Single Photon Emission Computed Tomography*). A SPECT é uma modalidade em medicina nuclear onde uma série de imagens é adquirida, através da gama câmara rotatória (PAULA, 2011). Os componentes do sistema de detecção da gama câmara são:

- Colimador: Os raios gama não estão unicamente se dirigindo em direção à máquina. Por isso, o colimador é usado para permitir que apenas aqueles raios, que viagem numa certa direção, atinja o detector. Existem três principais tipos de furos de colimador: paralelos, divergentes e convergentes.
- Cristal: É o “receptor” da radiação. A radiação, depois de colimada, atinge o cristal e interage com este. O cristal de iodeto de sódio, ativado com partículas de tálio, recebe o feixe incidente de radiação direcionado pelo colimador, emitindo luz - cintilação do cristal – proporcional à energia da radiação incidente, que é convertida em sinal

elétrico pelas fotomultiplicadoras. Este sinal é enviado, então, ao sistema eletrônico associado, para determinar contagens por área e pontos luminosos, que são detectados nos eixos x e y para formação das imagens cintilográficas (ARQ. BRAS. DE CARDIOLOGIA, 2006).

- Células Fotomultiplicadores: São detectores que multiplicam o sinal produzido pela luz incidente, aproximadamente 100 milhões de vezes, possibilitando um único fóton ser detectado quando a luz incidente é fraca. Estas amplificam o sinal e transformam em energia elétrica para ser processado pelo computador.

Os múltiplos sinais ampliados pelos fotomultiplicadores em posições conhecidas são enviados a um circuito de posicionamento, dito discriminador de sinais, que estima a origem do sinal verdadeiro em X e Y. Quando a informação do fóton chega a esse circuito, ele envia a informação ao computador que fornece a posição do fóton nos eixos X e Y. A intensidade do sinal fornece a informação da energia do fóton, no posicionamento X e Y, indicando a tonalidade do pixel a ser representada na imagem (MENEGHETTI, CHALELA, 2002).

A radiação, depois de colimada, atinge o receptor (cristal) e interage com este de quatro maneiras:

1. Evento Válido: O raio gama é emitido paralelamente a abertura do colimador, atravessa uma delas e interage fotoeletricamente com o cristal, depositando toda a sua energia em apenas um local. Essa interação seria a ideal, pois todo fóton incidido seria convertido totalmente em energia elétrica.
2. Detecção de Espalhamento: O raio gama é emitido paralelamente às aberturas do colimador, atravessa uma delas e interage por espalhamento Compton com o cristal. O raio espalhado pode interagir uma segunda vez com o detector. Para a imagem, essa segunda interação pode não ser satisfatória, pois pode causar perda da nitidez.

3. Espalhamento do Objeto: O raio não é emitido na direção das aberturas do colimador, mas é espalhado pelo corpo e passa pelos buracos do colimador, sendo detectado. O raio perde energia durante o espalhamento e produzirá um sinal menor para o detector.
4. Penetração Septal: O raio gama é emitido em direção ao colimador, mas não paralelamente a ele. Por conta da atenuação incompleta, causada pelas paredes finas do colimador, há certa chance do raio atingir o cristal e interagir com ele.

Os programas de reconstrução de imagem têm corretores de linearidade e uniformidade. Esses programas tentam evitar o borramento e o aparecimento de artefatos. Para capturar a imagem de SPECT a gama câmara é rotacionada em volta do paciente. São capturadas múltiplas imagens bidimensionais-2D do corpo do paciente. A radiação é captada em pontos definidos durante a rotação, normalmente a cada 3 graus - 6 graus. Na maioria dos casos é dada uma rotação com a gama câmara de 360 graus para conseguir otimizar a reconstrução. O tempo de captação, em cada ponto, é variável, mas é normalmente de 15 segundos a 20 segundos. O que permite um tempo total de exame entre 15min e 20 min. As máquinas mais modernas têm mais de uma cabeça, que é a parte da máquina que contém todo o sistema de detecção. Quanto mais cabeças a máquina tiver, maior área será coberta com a captação de radiação simultaneamente. O que resultará em um menor tempo total de exame (MENEGHETTI, CHALELA, 2002).

As intensidades de atividades podem ser representadas em escala de cinza ou em “pseudo-cor”, depende do procedimento. As imagens em “pseudo-cor” são mais comuns em exames que mostram o cérebro e o coração. A resolução pode ser de 64x64 ou 128x128 pixels, cada pixel representando uma parte de 3 mm - 6 mm do corpo do paciente. A resolução da imagem dependerá da energia da partícula incidente. Se a energia do fóton for muito baixa, haverá maior probabilidade de acontecer os eventos de detecção definidos em 2 a 4, que não são ideal, como, detecção de espalhamento, espalhamento do objeto e penetração septal. Isso dependerá da espessura do cristal, que não pode ser muito grosso, tendo que assumir uma espessura adequada, para diminuir a probabilidade de acontecer principalmente o evento de detecção de espalhamento. Se a coleta de dados não for muito eficiente, haverá prejuízo para a

imagem, conseqüentemente, prejudicando a análise diagnóstica da imagem. A distância entre paciente e cristal está ligada diretamente à eficiência de coleta. Quanto menor a distância, maior a eficiência de coleta. É por isso que, no momento do exame, as cabeças da máquina são aproximadas o máximo do paciente. Cada tipo de furos no colimador tem o seu campo de captação. O colimador de furos paralelos capta radiação de uma área exatamente do tamanho da perfuração. O colimador de furos convergentes capta radiação de uma área menor do que a dele, atendendo a uma forma de funil. E o colimador divergente capta radiação de uma área maior do que a dele, assumindo a forma de um leque (MENEGHETTI; CHALELA, 2002).

Nas imagens geradas para exames de perfusão do miocárdio, é mais evidente a presença do ventrículo esquerdo. Isso ocorre porque a parede do miocárdio é mais espessa e possui maior perfusão no ventrículo esquerdo, conseqüentemente, a captação do marcador é maior. O exame SPECT quando sincronizado com o eletrocardiograma é chamado de Gated-SPECT (PAULA, 2011).

#### 4.3.3.2 Tomografia por emissão de pósitron - PET

A tomografia por emissão de pósitrons (PET, do inglês *Photon Emission Tomography*) tem sido amplamente utilizada em diversos países, não só no campo da cardiologia, mas também na oncologia e neurologia. No Brasil há limitações para o desenvolvimento desta tecnologia, devido à dificuldade de produção dos traçadores. Para essa produção, são utilizados aceleradores de partículas do tipo cíclotron, que geram principalmente traçadores de meia vida bastante reduzida. A meia vida física curta dificulta a distribuição, transporte e comercialização destes traçadores. Uma exceção é a fluordesoxiglucose, 18-FDG, com uma meia-vida relativamente mais longa, de 120 minutos (MENEGHETTI; CHALELA, 2002).

O exame com PET é uma modalidade diagnóstica não invasiva, que usa radiofármacos para apreender e medir processos bioquímicos tissulares. Como outras técnicas de medicina nuclear, o exame demarca a doença em termos de uma química regional quantitativamente anormal. Ela mede a atividade metabólica das células corporais, permitindo a investigação da perfusão, dos caminhos metabólicos e dos processos biomoleculares em estados normais e patológicos (PEREGRINO et al., 2004).

O exame fornece imagens da função e da bioquímica corporais. Essa tecnologia utiliza derivados de compostos biologicamente ativos ou fármacos, marcados com emissores de pósitrons, e que são processados internamente de uma maneira virtualmente idêntica às suas contrapartidas não radioativas, fornecendo o mecanismo para registrar a atividade metabólica *in vivo*. A distribuição desses compostos pode ser medida com um tomógrafo PET, que produz imagens e índices quantitativos dos tecidos e órgãos corporais. Dessa maneira, o metabolismo da glicose, o transporte de aminoácidos, a síntese de proteínas, a divisão celular, o consumo de oxigênio, o fluxo sanguíneo e o status dos diversos neurorreceptores podem ser determinados. Processos bioquímicos como esses podem estar alterados em várias doenças e traçadores desses processos podem ser usados para detectar sua presença, na ausência de alterações estruturais grosseiras ou o avanço das mesmas (PEREGRINO et al., 2004).

Em cardiologia, as principais aplicações potenciais do PET incluem: avaliação da viabilidade miocárdica em pessoas com doença coronariana e disfunção cardíaca permitindo uma melhor

seleção de pacientes para processos de revascularização e evitando angiografias, angioplastias e by-pass em pacientes que não se beneficiariam com esses procedimentos; diagnóstico de doença coronariana nos casos de outras investigações inconclusivas (PEREGRINO et al., 2004).

De acordo com Robert e Milne (1999), não há muito consenso entre os especialistas acerca do futuro papel da PET na área cardiológica. A Associação Americana de Cardiologia, revendo os dados disponíveis, não identificou uma maior acurácia diagnóstica da PET em relação à SPECT na detecção de doença coronariana.

O princípio básico de PET e de SPECT é que a instrumentação utilizada é apenas receptora de informação, isso quer dizer que, para obter as imagens é necessário administrar aos pacientes um radiofármaco, quer com um emissor de pósitrons para a PET, quer com um emissor de fóton simples no caso de SPECT. E, apesar da eficiência de detecção do sinal radioativo ser maior com PET do que com SPECT, seu uso fica limitado. Os radioisótopos emissores de pósitrons têm uma meia-vida radioativa muito curta, da ordem de minutos, e de no máximo cerca de duas horas para o flúor-18, e têm que ser produzidos num ciclotron, cuja disponibilidade em geral é reduzida a apenas alguns centros de investigação científica de grande poder econômico (POWSNER et al., 2006).

SPECT torna-se assim uma proposição mais econômica e, portanto com maior disponibilidade. A melhoria de qualidade das gama câmaras, particularmente no que diz respeito à resolução e à eficiência de detecção utilizando detectores múltiplos e colimadores de tipo “*fan-beam*”, isto é, quando feixes em forma de leque atingem o paciente, e juntamente com o desenvolvimento de novos radiofármacos, tem levado a um aumento crescente do interesse pela técnica (POWSNER et al., 2006).

A melhoria das técnicas de análise, com incorporação cada vez mais frequente de processos de quantificação mais e mais precisos e corroborados por estudos empíricos, tem propiciado uma maior credibilidade na técnica de SPECT (POWSNER et al., 2006).

#### 4.3.3.3 Cintilografia de perfusão do miocárdio

A medicina nuclear é uma especialidade médica que permite observar o estado fisiológico dos tecidos de forma não invasiva, através da marcação de moléculas participantes nesses processos fisiológicos com isótopos radioativos, compondo os radiofármacos. Os radiofármacos são administrados por via oral, intravenosa ou respiratória, disseminando-se por todo o corpo. Para que exista uma predominância do radiofármaco na região que se deseja estudar, devem-se utilizar fármacos seletivos ou específicos para cada região do corpo.. Então, cada radiofármaco tem a capacidade de se internalizado em uma determinada estrutura do organismo, ou participar da cinética da funcionalidade de um determinado órgão. Depois de captados, os fótons gama emitidos pelo radioisótopo são identificados por uma gama câmara que permite formar imagens ou filmes acerca do estado funcional do órgão (PAULA, 2011).

A cintilografia miocárdica se tornou a ferramenta padrão de diagnóstico para as doenças cardíacas, tais como doença arterial coronariana, miocardite, rejeição de transplante de coração, induzida por quimioterapia cardiotoxicidade, e outros (ALEXANDER et al., 1995).

No exame de cintilografia do miocárdio utiliza-se um radiofármaco injetado através de uma veia periférica, sendo posteriormente captadas pelos miócitos, células do coração. Esse processo é chamado de perfusão miocárdica. Nas diversas partes do coração, o radioisótopo associado ao fármaco injetado emite uma radiação que é convertida em uma imagem por cintilação observada através de uma tomografia cardíaca. As imagens são obtidas em duas etapas: repouso e estresse. Os radiofármacos se acumulam proporcionalmente ao fluxo sanguíneo miocárdico regional, e respondem a um padrão ou diminuição de intensidade da captação do radioisótopo em alguma parte do músculo cardíaco significando hipocaptação. Quando essa hipocaptação é transitória indica isquemia coronariana, quando é persistente indica fibrose. Dessa forma, a cintilografia de perfusão miocárdica permite pesquisar as áreas viáveis de se tratar, separando as das áreas inviáveis ao tratamento. Nesse caso, a pesquisa é chamada de viabilidade miocárdica (CHALELA; MENEGHETTI, 2005).

De acordo com Saha (1983) as primeiras imagens cintilográficas de perfusão miocárdica foram adquiridas, em 1944, por Carr et al., com céσιο-131. Em 1973, Zaret et al., identificou a

isquemia miocárdica por estresse induzida com potássio-43. Em 1974 foi à vez do tálio-201, análogo ao potássio, e tem sido utilizado com êxito há mais de 25 anos. No início da década de 90, novos compostos marcados com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) com novas propriedades biológicas foram introduzidas para avaliação da perfusão miocárdica. Qualquer um desses agentes perfusionais pode ser utilizado para análise da distribuição relativa do fluxo sanguíneo miocárdico.

A aplicação clínica mais importante da imagem de perfusão miocárdica com estresse é a avaliação de doença isquêmica cardíaca. Estudos mostram a utilização diagnóstica com exercício envolvendo  $^{201}\text{Tl}$  ou com agentes marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ . Geralmente, a concordância entre os resultados da cintilografia miocárdica com estresse, e os achados da angiografia da artéria coronária contrastada é satisfatória. Há evidências suficientes de que os achados na cintilografia de perfusão com estresse refletem a repercussão hemodinâmica e funcional da estenose da artéria coronária, fornecendo importantes informações prognósticas (VIANA, 2008).

As imagens de perfusão miocárdica são interpretadas qualitativamente pela análise visual, frequentemente, com quantificação computacional. Quando apresenta-se normal, a captação é difusamente homogênea. Um defeito representa uma área miocárdica localizada com menos captação do que a normal. Os defeitos podem variar em intensidade, de discretamente reduzida, até ausência quase completa de captação. É considerado defeito reversível quando presente na fase inicial de estresse que desaparece ou diminui de intensidade na fase de repouso, ou nas imagens tardias. Esse padrão indica isquemia miocárdica. É chamado de redistribuição, quando usando  $^{201}\text{Tl}$ , a intensidade da imagem melhora no decorrer do tempo; com exceção para os compostos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  (BRAUNWALD et al., 2003).

Quando um defeito está presente nas fases de exercício e de repouso, ou em imagens tardias, e não se modifica, então é considerado defeito fixo. Esse padrão indica, normalmente, infarto e tecido fibrótico. Contudo, em alguns pacientes, os defeitos fixos nas imagens com  $^{201}\text{Tl}$ , após 2h a 4h da injeção, apresentam melhora da captação nas imagens de redistribuição de 24h ou após reinjeção no repouso. Da mesma forma, um defeito fixo com agentes marcados com  $^{99m}$

Tc, que envolve injeção no repouso, pode subestimar a viabilidade miocárdica (MENEGHETTI; CHALELA, 2002).

O padrão de imagem chamado redistribuição reversa, ocorre principalmente nas imagens com  $^{201}\text{Tl}$ . Todavia, um defeito reverso é observado ocasionalmente com os agentes marcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . A imagem inicial de estresse mostra um defeito ou um padrão normal, enquanto as imagens tardias ou de repouso mostram um novo defeito ou um defeito ainda mais grave. Esse padrão ocorre frequentemente em pacientes com infarto submetidos à terapêutica trombolítica ou angioplastia percutânea da artéria coronária. O fenômeno é possivelmente causado por um excesso inicial de captação do traçador numa área reperfundida com mistura de tecido necrótico e miócitos viáveis. A acumulação inicial é seguida por uma rápida depuração dos tecidos necróticos. Embora a importância desse achado seja controverso, ele não representa evidência de isquemia estresse-induzida. A PET com fluorodeoxiglicose – FDG tem demonstrado a presença de miocárdio viável nas áreas de redistribuição reversa (MENEGHETTI; CHALELA, 2002).

No que diz respeito a captação pulmonar, normalmente, nenhuma ou muito pouca atividade é percebida nos campos pulmonares nas imagens pós-exercício. O aumento da captação pulmonar pode ser quantificado com a razão pulmão/coração, onde valores menores que 0,5 para o  $^{201}\text{Tl}$  e menor que 0,45 para  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi apresenta-se normal. Esse padrão de imagem anormal indica disfunção ventricular esquerda estresse-induzida, e grave doença da artéria coronária, além de indicar um mau prognóstico. Quando o ventrículo esquerdo aparecer maior nas imagens de exercício que nas imagens de repouso ou tardias pode indicar dilatação transitória do ventrículo esquerdo. Esse padrão de dilatação também indica disfunção ventricular esquerda estresse-induzida. Há sugestões de que ao invés de um real aumento no volume ventricular esquerdo, a causa desse padrão seria hipocaptação subendocárdica do radiotraçador e, conseqüentemente, aparente afinamento do miocárdio nas imagens de estresse (MENEGHETTI; CHALELA, 2002).

Usualmente, o ventrículo direito é apenas discretamente visualizado no repouso ou no estresse nas imagens SPECT de perfusão miocárdica. A massa miocárdica e o fluxo sanguíneo do ventrículo direito são, aproximadamente, 50% menores em relação ao ventrículo esquerdo. O

aumento da visualização do ventrículo direito em repouso é anormal e na maioria dos casos indica hipertrofia do mesmo. Quando esse padrão ocorre nas imagens em exercício, está associado á doença grave da artéria coronária (MENEGHETTI; CHALELA, 2002).

Ainda, de acordo com a sociedade brasileira de cardiologia, o diagnóstico de isquemia silenciosa se estabelece da detecção de alterações objetivas e características de dano miocárdico isquêmico. Dentre os métodos, se configuram principalmente, a eletrocardiografia de esforço, a monitorização eletrocardiográfica ambulatorial, o teste de perfusão com tálio-201 e o ecocardiograma de esforço (MENEGHETTI; CHALELA, 2002).

A Figura 7 representa uma redenrização, isto é, processo pelo qual se pôde obter o produto final de um processamento digital, nesse caso, tridimensional, a partir de 64 cortes de uma angiografia por tomografia computadorizada fundida a cintilografia de perfusão miocárdica - SPECT. Observa-se a zona isquêmica, escura à esquerda.

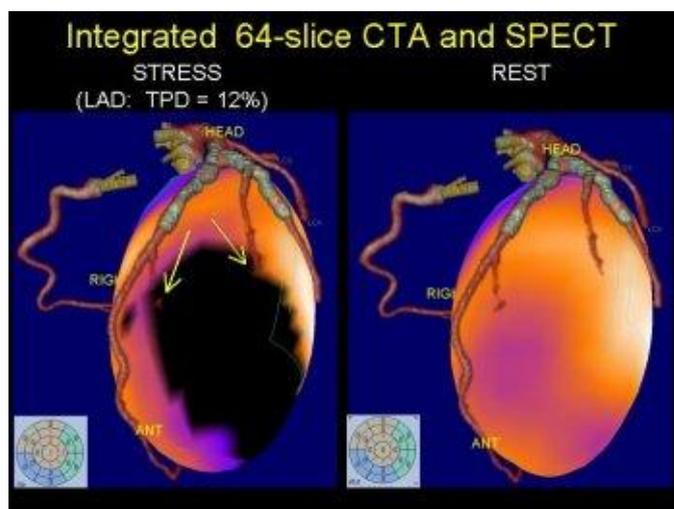


Figura 7 – Redenrização tridimensional a partir de 64 cortes de uma angiografia por TC fundido a cintilografia de perfusão miocárdica (SPECT) Fonte: Adaptado de Dr. Piotr J. Slomka – Cepars Sinai Medical Center – University of California/Los Angeles.

A Figura 8 apresenta um fantoma físico de coração com defeitos de tamanhos variados, envolto em meio de atenuação não uniforme, imagem SPECT quando preenchidos com  $^{201}\text{Tl}$  ou  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , e no modo PET, preenchidos com FDG-18. As imagens mostram a atenuação progressiva do ápice para a base. A imagem PET mostra correção uniforme de atenuação.

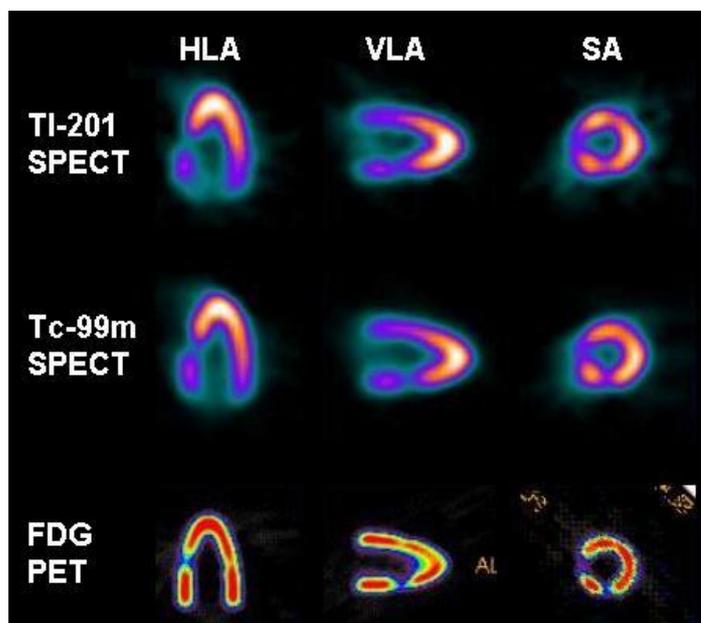


Figura 8 – Imagens de um fantoma físico de coração com defeitos de tamanhos variados, envolto em meio de atenuação não uniforme, imagem SPECT quando preenchidos com  $^{201}\text{Tl}$  ou  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , e no modo PET, preenchidos com FDG-18. Fonte: Adaptado do 2º Congresso Virtual de Cardiologia – Federação Argentina de Cardiologia, 2001.

Na Figura 9 observa-se um exemplo de estudo da perfusão miocárdica estresse-repouso com Tc-99m MIBI (SPECT/CT). O estudo de estresse foi adquirido uma hora após a administração do marcador na frequência cardíaca máxima durante o exercício de esteira. Já o estudo de repouso ocorreu 4h mais tarde, após a reinjeção de dose do traçador.

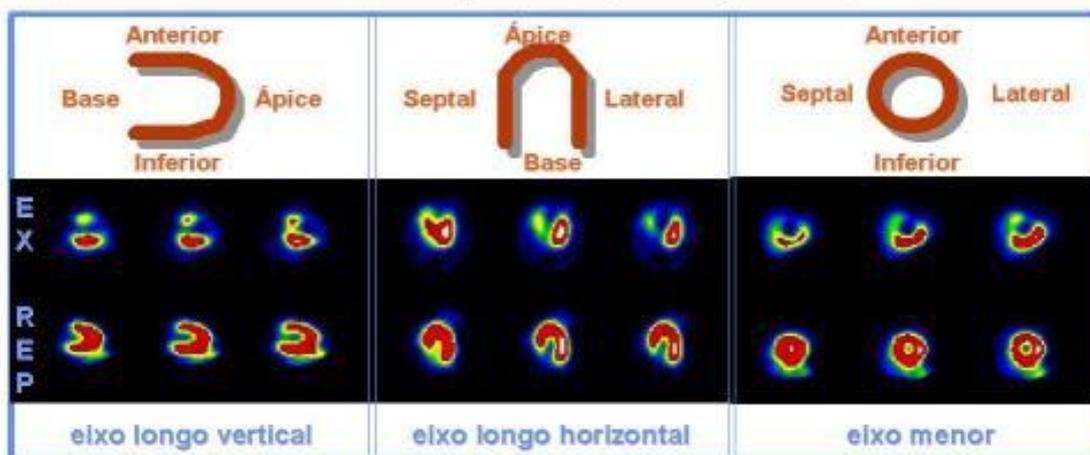


Figura 9 – Imagens cintilograficas de um estudo de perfusão miocárdica estresse-repouso com Tc-99m MIBI (SPECT/CT). Fonte: [http://www.incor.usp.br/PET/Medicina\\_Convencional.html](http://www.incor.usp.br/PET/Medicina_Convencional.html).

A Figura 10 demonstra uma cintilografia radionuclídea para avaliar perfusão miocárdica e viabilidade. Exemplificando indução de estresse, defeito de perfusão reversível indica miocárdio viável.

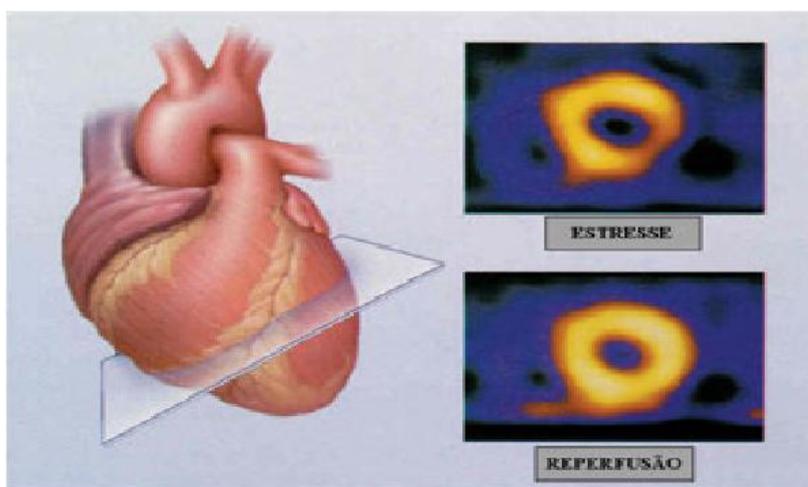


Figura 10 – Imagens de indução de estresse, defeito de perfusão reversível – Indicando miocárdio viável. Fonte: <http://cardiopapers.com.br/2011/04/acc-2011-stich-2/>.

## **4.4 Modelos e objetos simuladores**

### **4.4.1 Monte Carlo N-Particle Transport code – MCNP**

O MCNP é um software na linguagem Fortran 90 para simular processos nucleares. Foi desenvolvido baseado no método de Monte Carlo para simular as interações das partículas nêutrons, gamas e elétrons com a matéria em diferentes níveis de energia. A faixa de energia de interação dos nêutrons com os isótopos varia entre  $10^{-5}$  eV a 20 MeV, mas para alguns isótopos pode chegar até 150 MeV, para os fótons entre energias de 1 keV até 100 GeV, e para elétrons entre 1 keV até 1 GeV (CABRERA, 2013).

O MCNP realiza cálculo em média das partículas com o mesmo comportamento no sistema físico e, como resultado final, são obtidos os aspectos mais importantes no percurso de um conjunto de partículas que atravessam um meio, ou seja, o número médio de alguma característica do sistema como, por exemplo: fluxo, deposição de energia, corrente, cálculos de criticalidade, e outros (CABRERA, 2013).

O método de Monte Carlo pode ser usado para simular teoricamente um processo estatístico como, a interação de partículas nucleares com materiais, e é particularmente interessante para resolver problemas de transportes nucleares complexos que não podem ser modelados por códigos baseados em métodos determinísticos. Em transporte de partículas, a técnica de Monte Carlo consiste em seguir cada uma de muitas partículas durante toda sua trajetória até algum evento terminal como absorção, escape, entre outros. A simulação tridimensional do transporte de partículas nucleares é uma importante ferramenta para melhoria dos procedimentos radioterápicos em oncologia (BRANDÃO, 2008).

#### 4.4.2 Código SISCODES

Sistema de Códigos para Cálculos de Dose Absorvida por Método Estocástico – SISCODES é um programa computacional desenvolvido em 2003, pelo grupo de pesquisa Núcleo de radiações ionizantes – NRI, do Departamento de Engenharia Nuclear da Escola de Engenharia da UFMG, registrado no CT&T/UFMGe INPI, com o propósito de criar modelos computacionais de voxel para serem usados em simulações computacionais de protocolos de irradiação via código MCNP, através de cálculo de dose e simulação de radioterapias (TRINDADE; CAMPOS, 2004; BRANDÃO, 2008; TRINDADE; CAMPOS, 2011).

O programa utiliza o sistema operacional Linux e tem arquitetura cliente/servidor, utilizando a internet como canal de comunicação para que o cálculo estocástico possa ser executado em computadores de maior velocidade de processamento, melhorando consideravelmente o tempo de resposta do sistema e minimizando os custos de implantação e manutenção do mesmo (TRINDADE; CAMPOS, 2004; BRANDÃO, 2008).

Após a construção, nesse caso, do coração em modelo de voxel, o SISCODES funciona como uma interface, convertendo o modelo a outro formato, de maneira que o MCNP realize a leitura. Assim, o transporte das partículas através dos voxels e a interação das mesmas com o tecido são avaliados. Então, o MCNP devolve ao SISCODES os dados obtidos da simulação, como a dose absorvida em cada voxel, ou o número de partículas incidentes por unidade de área, a fluência. Dessa forma o SISCODES é capaz de gerar as curvas de isodoses no modelo, que são apresentadas em cores que representam a porcentagem de dose absorvida ou de fluência, dependendo do que foi solicitado ao MCNP durante a simulação.

## 5 SIMULADORES FÍSICOS PARA DOSIMETRIA

### 5.1 Desenvolvimento do simulador físico do coração

Devido à complexidade de avaliar a dosimetria da técnica de perfusão do miocárdio, se faz necessário o desenvolvimento de simuladores físicos do coração. Esses não existem disponíveis e devem então ser preparados para tal fim. Nesta etapa será apresentada a elaboração de um objeto simulador físico do coração, construído a partir de moldes e tecido equivalente.

#### 5.1.1 Métodos e Resultados

Para a reprodução do tecido cardíaco-equivalente foi seguido um protocolo pré-existente elaborado no NRI, que consistiu em incorporar compostos químicos solúveis, ditos aditivos, constituído de nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, ferro, potássio, dentre outros, em proporção estequiométrica necessária para compor os tecidos do coração. Foi usado como base Agar-agar em solução aquosa. Nesta tentativa, foi observado que o tecido cardíaco-equivalente reproduzido apresentou características de instabilidade em sua estrutura física e química, principalmente redução de volume em função da temperatura. Necessitou-se então de novos aprimoramentos para torná-lo mais estável e compatível a exposição ao meio ambiente e ao desgaste ao longo do tempo cronológico.

Os testes foram realizados substituindo a água destilada por látex de uso industrial associado aos compostos químicos aditivos. A mistura era aquecida em agitação, agitador-aquecedor mod.258, à temperatura de 70 °C. Quando aquecido em estufa, à mesma era programada para 60 °C em 60 min com rampa de 2,5 °C/min<sup>-1</sup>. Os compostos químicos constituintes da mistura foram: carboximetilcelulose (sal sódico), acetato de Amônio P.A. (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>), sulfato de amônio P.A. ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>), potássio monobásico P.A. – ACS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), cloreto de

amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); associados a água destilada ou látex (uso industrial – casa da resina) e aquecidos em estufa para esterilização e secagem e/ou agitador.

Então, na formação do fantoma de coração, a composição de carbono foi aumentada com a introdução de grafite em pó; assim, foram utilizados os seguintes produtos:  $\text{NH}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Na}_8\text{O}_{27}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ , grafite em pó e látex de uso industrial. Todos os compostos foram misturados e pré-aquecidos. Após o processo de modelagem do órgão, a mistura foi vertida em forma de moldagem. A forma foi então levada à estufa durante aproximadamente 80 min, a uma temperatura de 80 °C. Esta etapa se repetiu, com preenchimentos graduais, quantas vezes foi necessário para a construção do órgão.

Após secagem, o órgão sintético foi preenchido internamente com uma mistura de Agar-agar diluído com compostos químicos, similar ao sangue e fechado juntando as partes. O órgão sintético preenchido foi então, submetido a testes radiográficos em raios-X convencional e tomografia computadorizada, para avaliação da resposta radiológica comparativa. Foi feita análise comparativa anatômica das estruturas, do tecido cardíaco-equivalente e da densidade radiológica.

As figuras 11, 12, 13 e 14 demonstram os resultados encontrados. A figura 11 representa amostras do tecido cardíaco-equivalente à base de elastômero, onde todas as cinco amostras apresentam consistência e densidades adequadas.



Figura 11. Amostras dos tecidos cardíaco-equivalentes à base de elastômero.

A figura 12 mostra uma imagem representativa de como foi feito o molde para o simulador físico do coração em silicone.

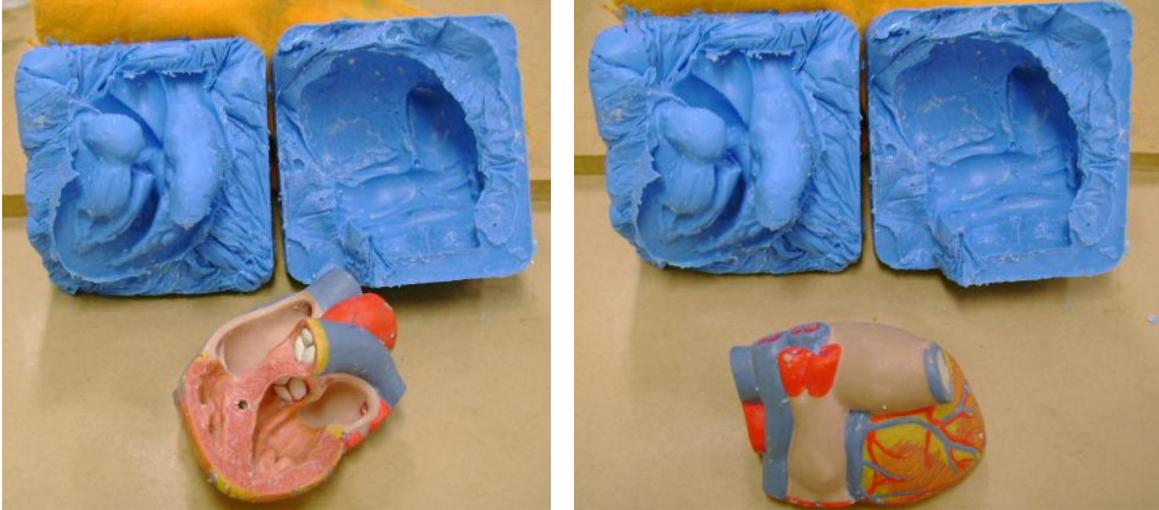


Figura 12. Imagem representativa de como foi feito o molde para o simulador físico do coração em silicone.

A figura 13 mostra uma das etapas de desenvolvimento do simulador físico do coração, onde o tecido cardíaco-equivalente foi colocado no molde de silicone, e levado à estufa, como descrito anteriormente.

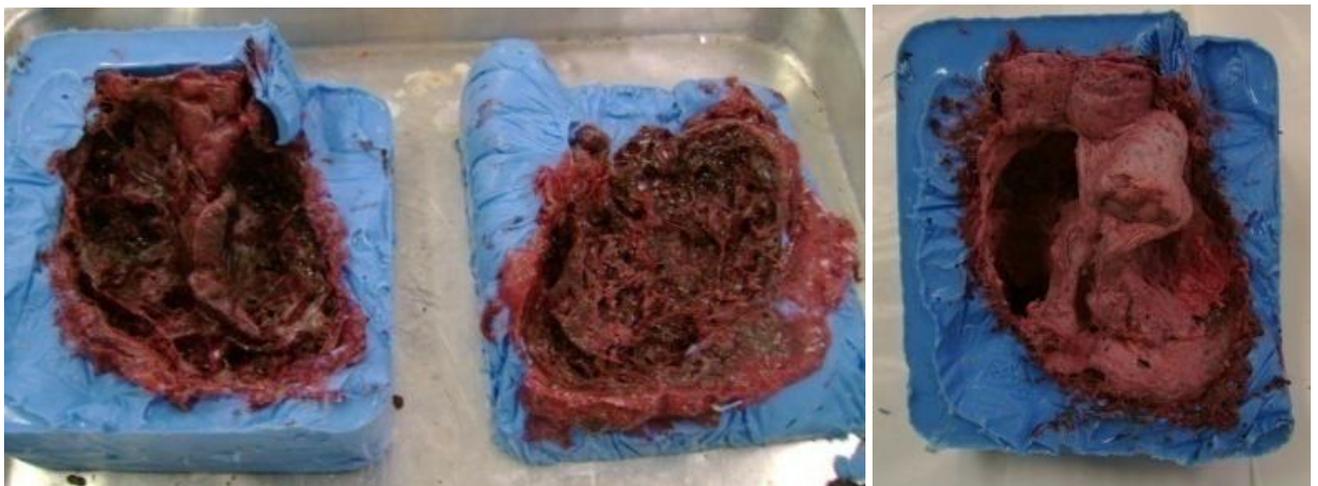


Figura 13. Modelos preenchidos do simulador físico do coração, desenvolvimento após secagem em estufa. Vista do interior e após fechamento das partes, respectivamente.

A figura 14 mostra vista posterior do simulador físico do coração completo, e sua respectiva imagem tomográfica em corte axial, bem como, imagem tomográfica das amostras.



Figura 14. Vista posterior do fantoma do coração completo e sua respectiva imagem tomográfica em corte axial.

Diante desses resultados concluímos a possibilidade da construção do fantoma físico, dito simulador físico do coração, através de tecido equivalente a base de elastômero. O protótipo desenvolvido permitirá ser empregado em processos dosimétricos a serem executados no grupo de pesquisa NRI. O simulador físico do coração será incorporado ao fantoma de tórax para fins de dosimetria cardíaca em radioterapia, radiologia e cintilografia de perfusão do miocárdio.

## 5.2 Simulador tridimensional via Invesalius 3D

Para a realização do estudo de desenvolvimento gráfico do sistema vascular torácico para fins de reprodução de biomodelos, foi utilizado um software público, dito Invesalius. Este código permite criar modelos virtuais tridimensionais de estruturas anatômicas, a partir de imagens bidimensionais em formato DICOM (do inglês, *Digital Imaging Communications in Medicine*) providas de tomografia computadorizada e ressonância magnética. O software auxilia no diagnóstico, planejamento cirúrgico, ensino, pesquisas, e oferece ferramentas de computação gráfica e processamento de imagens. Com base em exames de ressonância

magnética e tomografia computadorizada, os protótipos são gerados. Embora essa técnica de biomodelagem seja relativamente nova na área médica, os resultados têm demonstrado satisfatórios em cirurgias bucomaxilofaciais e de reconstrução craniofacial. O software é aplicado também nas áreas de antropologia, paleontologia e veterinária (GORNI, 2001).

O Invesalius foi criado visando facilitar o planejamento de cirurgias complexas com o auxílio da computação gráfica e da prototipagem rápida, por pesquisadores da Divisão de Desenvolvimento de produtos do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer, em agosto de 2001, sob o título de Prototipagem Rápida na Medicina – ProMed. O projeto ofereceu um conjunto de soluções inovadoras, modelos virtuais tridimensionais e protótipos de partes do corpo. O termo prototipagem rápida designa tecnologias usadas para se fabricar objetos físicos a partir de fontes de dados gerados por sistemas computacionais. Esses métodos são próprios, pois agregam materiais, de forma a constituir o objeto desejado. Oferece-se assim a vantagem do protótipo para auxílio visual e testes prévios (SILVA, 2010).

Inicialmente, o programa era distribuído gratuitamente, mas com distribuição rigorosa de quem o utilizava. A partir de novembro de 2007 o Invesalius foi disponibilizado como software livre no Portal do Software Público ([www.softwarepublico.gov.br](http://www.softwarepublico.gov.br)), consolidando comunidades de usuários e desenvolvedores (SILVA, 2010).

O nome Invesalius é uma homenagem ao médico belga Andreas Vesalius (1514-1564), considerado o "pai da anatomia moderna". Trata-se de uma ferramenta simples, livre e gratuita, robusta, multiplataforma, com comandos em português, com funções claras e diretas, de fácil manuseio (SILVA, 2010).

O uso das tecnologias de visualização e análise tridimensional de imagens médicas, integradas ou não a prototipagem rápida, auxiliam o cirurgião no diagnóstico de patologias e permitem que seja realizado um planejamento cirúrgico detalhado, simulando com antecedência intervenções complexas, que podem envolver, por exemplo, alto grau de deformidade facial ou a colocação de próteses (FOGGIATTO, 2006; SILVA, 2010).

### 5.2.1 Métodos e Resultados

Para a manipulação das imagens são necessários softwares ou programas biomédicos específicos. Os principais softwares utilizados em prototipagem biomédica são o Analyze® (*Mayo Foundation, EUA*), o MIMICS® (*Materialise, Bélgica*) e o Biobuild® (*Anatomics, Austrália*). Esses programas apresentam algumas funções básicas para o processamento e conversão dos arquivos de imagens, e são necessários, pois os arquivos de imagens gerados pelo aparelho de Tomografia Computadorizada representam cortes 2D e são salvos no formato DICOM. Porém, para a construção de um biomodelo a estação de prototipagem necessita de arquivos 3D, preferencialmente no formato STL, ou arquivo de estereolitografia que é classificado, geralmente, como um arquivo CAD (do inglês, *computer aided design*), usado como o formato padrão de design estereolitografia, que é conhecido como a tecnologia desenvolvida para processos de prototipagem rápida, produção e desenvolvimento de componentes digitais 3D, foi o primeiro sistema de prototipagem desenvolvido e, devido ao pioneirismo dessa técnica, o termo estereolitografia é até hoje amplamente utilizado como sinônimo de prototipagem rápida, sendo seu formato padrão. Como mencionado anteriormente, atualmente já existe um software nacional, o ProMed desenvolvido no CenPRA que atende as funções básicas para integrar equipamentos de imagens biomédicas e prototipagem rápida, associado ao tratamento de imagens e visualização tridimensional (MEURER et al., 2007).

As imagens no formato DICOM de uma angiotomografia de aorta torácica e de aorta abdominal adquirida através do exame de tomografia computadorizada, foram tratadas por filtros computacionais e importadas para o sistema Invesalius.

A angiotomografia das artérias coronárias é realizada com aquisição helicoidal com 0,6 mm de espessura, durante a administração de cerca de 70 mL de meio de contraste iodado em via periférica. A angiotomografia do tórax com *gating* cardíaco, isto é, monitoramento com o ciclo cardíaco, permitiu a avaliação simultânea dos pulmões e do aparelho cardiovascular em um único método não invasivo e de forma extremamente rápida, possibilitando o diagnóstico diferencial de patologias potencialmente fatais como o tromboembolismo pulmonar, a dissecação da aorta a isquemia coronariana. Então, através da angiotomografia como método

diagnóstico de tomografia computadorizada das artérias, não invasivo, cuja formação de imagem depende da atenuação radiográfica dos tecidos e dos meios de contraste para a visualização da imagem, é possível a reconstrução tridimensional das imagens em alta definição (SVENSSON; CRAWFORD, 1992).

Ao instalar o Invesalius, um ícone é criado na área de trabalho. Com o programa aberto, inicia-se o trabalho de segmentação clicando sobre o arquivo e em seguida importando as imagens DICOM, que é o formato padrão de arquivo gerado por equipamentos de imagens médicas.

Com o software Invesalius e arquivos contendo os cortes coronais de tomografia computadorizada, as imagens foram carregadas para visualização. Para cada corte foi realizado o trabalho utilizando as ferramentas avançadas de edição designadas como, tipo, tamanho e operação do pincel. Foi definida a opção “apagar” para excluir as partes não relevantes mantendo as estruturas de interesse, que no caso é o sistema vascular torácico disponibilizando-o para as tarefas de selecionar, segmentar e manipular para então atingir o objetivo de construção do volume total 3D que é exportado no formato STL, permitindo assim ser manipulado para construção e desenvolvimento do biomodelo.

Os resultados podem ser observados nas figuras 15 e 16. A figura 15 mostra o modelo inicial de imagem em corte coronal importada DICOM do exame de angiotomografia de aorta torácica, a área em lilás representa tecido muscular adulto, e as regiões externas à vascularização em tom de cinza claro são órgãos sem relevância. Os tons de branco identificam os ossos, e o contraste utilizado no exame para melhor visualização dos vasos.



Figura 15. Modelo inicial de imagem em corte coronal importada DICOM de uma angiotomografia de aorta torácica.

A figura 16 exemplifica o trabalho de manuseio das imagens importadas, através das ferramentas oferecidas pelo software público Invesalius, que disponibilizam tarefas de alteração de cor do tecido muscular, bem como permite apagar áreas não relevantes para o objetivo de reconstrução de imagem em volume 3D.



Figura 16. Modelos finais de imagens em cortes coronais importadas DICOM de uma angiotomografia de aorta torácica para construção do volume.

A figura 17 é uma representação do resultado final, isto é, reconstrução das imagens DICOM da angiotomografia importada para o programa Invesalius, selecionadas, segmentadas e direcionadas ao sistema vascular torácico. A cor vermelho escuro e azul mostradas na figura 17 com o resultado em volume tridimensional representam as regiões consideradas vasculares.

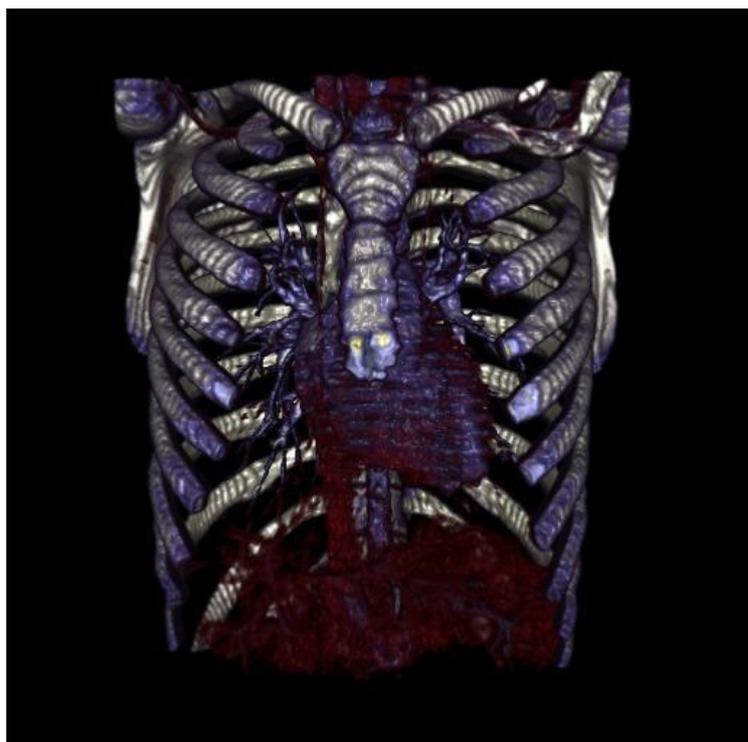


Figura 17. Imagem final representativa do volume 3D

O programa de manipulação de imagens, Invesalius, ainda requer algumas melhorias que permitam uma melhor delimitação dos tecidos a serem reproduzidos. Essa deficiência não comprometeu a reprodução do modelo em STL, entretanto, sua transferência para prototipagem ficou comprometida por falhas do software que não foram solucionadas.

Foi possível concluir que é viável o desenvolvimento de moldes do coração a partir da prototipagem rápida utilizando o código Invesalius. O tempo de desenvolvimento do molde é significativamente reduzido, comparado com a técnica de modelagem manual. A fidelidade comparativa anatômica do mesmo é muito maior, com precisão na reprodução de detalhes da estrutura em estudo. O arquivo do modelo em STL foi elaborado e está disponível no NRI.

## **6 DOSIMETRIA EM CINTILOGRAFIA DE PERFUSÃO DO MIOCÁRDIO COM TÁLIO-201**

O objetivo da cintilografia de perfusão do miocárdio é investigar se uma área do coração possui ou não viabilidade, ou seja, se está viável significa que apresenta áreas infartadas locais não lesionadas que poderão se recuperar através de infusão de fluxo sanguíneo gerado pela revascularização (GAMBHIR, 2001).

Apesar da ampla utilização do exame de cintilografia de perfusão do miocárdio, a distribuição da dose espacial no miocárdio é pouco estudada, talvez devido à complexa dinâmica do radiofármaco em cada estrutura anatômica. O tálio-201 tem sido usado clinicamente por mais de duas décadas, sem levar em consideração seus possíveis efeitos determinísticos das radiações no músculo cardíaco.

### **6.1 Métodos**

Foi utilizado um conjunto de cortes axiais de imagens radiológicas de tomografia computadorizada para construção do modelo computacional do coração em voxel com o código SISCODES. Este conjunto, depois de exportado para o código MCNP, serviu como base para investigação dosimétrica espacial do tálio-201, distribuído no coração para o exame de cintilografia de perfusão do miocárdio.

#### **6.1.1 Modelo do coração para cintilografia de perfusão do miocárdio**

Foi selecionado um conjunto de imagens contrastadas de tomografia computadorizada do coração com morfologia normal. O contraste foi importante, pois permitiu a separação de várias estruturas cardíacas. As imagens foram adquiridas a partir de um conjunto de cortes tomográficos do tórax de um adulto. A partir de 355 cortes axiais da tomografia

computadorizada, 60 imagens foram selecionadas, cada uma representando uma camada de 2 mm, incluindo o coração e o mediastino que são as regiões de interesse. Essas imagens foram obtidas através do formato DICOM (do inglês, *Digital Imaging and Communications in Medicine*), que é o padrão para armazenamento e transmissão de imagens médicas (DIGITAL IMAGING AND COMMUNICATIONS IN MEDICINE, 2006).

O conjunto de imagens foi selecionado limitando a região do coração, então convertidas em modelo de voxel dos tecidos pelo SISCODES. As imagens foram convertidas do formato DICOM para o formato JPEG devido à compatibilidade, e também convertidas para modelo tridimensional em escala de tons de cinza. Esse foi preenchido pelos tecidos com suas composições químicas e densidade de massa, disponíveis no banco de dados do SISCODES, juntamente com informações nucleares descritas de acordo com a ICRU-46 (ICRU, 1989). Cada tecido teve uma cor associada, seguindo a identificação dos diferentes tecidos usados no modelo.

Após a identificação de cada órgão e tecido, o protocolo de dosimetria foi simulado, com informações da fonte radioativa. Cada voxel do músculo cardíaco recebeu, no SISCODES, uma fonte distribuída de tálio 201. E a atividade por unidade de massa foi homogênea para todo o miocárdio, o que é uma simplificação da complexa dinâmica do tálio 201 no coração. O espectro gama do Tl-201 foi especificado de acordo com a literatura MIRD-ICRP, 1983.

O arquivo de entrada resultante foi simulado no código MCNP5 (MCNP-X5, 2003). No transporte de partículas, cada uma das partículas emitidas pelo Tl-201 é acompanhada através de suas interações até algum evento terminal como absorção ou escape. As simulações acompanham os efeitos de espalhamento junto ao tórax e pulmão que são essenciais no processo de deposição de energia. Depois da simulação, a saída foi exportada para o código SISCODES onde as curvas de isodose representativas da distribuição espacial de dose e o histograma dose versus volume foi obtido.

A avaliação da dose absorvida em cada voxel do coração pode ser obtida multiplicando o valor da simulação do MCNP ( $r$ ), em Gy por transição, pela atividade injetada no paciente ( $A$ )

em Bq, e pela integral da porcentagem da captação do coração no tempo definido pela função  $p(t)$ , nomeada fator de integração do tempo. Assim, a dose é expressa em:

$$D = r A \int_{t_i}^{t_f} p(t) dt \quad (5)$$

A função  $p(t)$  é influenciada por dois mecanismos distintos: o decaimento do radioisótopo Tl-201 e a dinâmica clínica do radiofármaco. Ambos os mecanismos tem comportamento exponencial, tal que  $p(t)$  pode ser expresso pela função biexponencial (CEMBER, 1983):

$$p(t) = C0 \cdot e^{\left(\frac{-\ln(2)t}{C1}\right)} + C2 \cdot e^{\left(\frac{-\ln(2)t}{C3}\right)} \quad (6)$$

onde  $C1$  e  $C3$  são constantes relativas para a meia vida da cinética do radiofármaco e do decaimento radioativo, e  $C0$  e  $C2$  são parâmetros que medem cada termo da exponencial.

### Validação

Devido à dificuldade de afluir *in vivo* medidas de dose diretamente ao músculo cardíaco, a validação com os resultados experimentais, não foram elaborados. Mas, permitiram comparar a dose absorvida calculada através de um método computacional, com um método analítico simplificado. Então, a taxa de dose no modelo de voxel do MCNP pode ser comparada analiticamente baseando em um modelo simplificado do coração.

Para uma distribuição uniforme de gamas emitidos pelo isótopo, a taxa de dose (DR) equivalente no centro da esfera (representando o coração) para o radionuclídeo é dada por:

$$DR = C \cdot \Gamma \cdot S \quad (7)$$

Em que  $C$  é a concentração do radioisótopo em unidade de  $\text{Bq.cm}^{-3}$ ,  $\Gamma$  (Gamão) é a emissão gama específica referente a emissão de raios gama, e  $S$  o fator geométrico em unidade de metro (CEMBER, 1983).

$$S = \frac{4\pi(1 - e^{-\mu r})}{\mu} \quad (8)$$

Em que  $\mu$  é o coeficiente de absorção de energia e  $r$  o raio da esfera (HUBBELL, 1969).

O fator  $\Gamma$  relaciona a atividade e taxa de exposição de um dado radionuclídeo específico. O fator  $\Gamma$  é definido como:

$$\Gamma_{\delta} = \frac{l^2}{A} \left( \frac{dK_{air}}{dt} \right)_{\delta} \quad (9)$$

onde  $(dK_{air}/dt)_{\delta}$  é a taxa de kerma no ar devido a fótons de energia maior que  $\delta$ , para uma distância  $l$  de uma fonte pontual de atividade  $A$ . A unidade SI para  $\Gamma_{\delta}$  é  $\text{J m}^2 \text{kg}^{-1}$  que se transforma em  $\text{Gy m}^2 \text{s}^{-1} \text{Bq}^{-1}$ , depois da conversão. Substituindo o kerma no ar na Eq.5,  $\Gamma$  pode ser escrito como:

$$\Gamma_{\delta} = \frac{1}{4\pi} \sum \left( \frac{\mu_k}{\rho} \right)_i p_i E_i \quad (10)$$

em que  $\rho$  é a densidade mássica,  $p_i$  é a probabilidade de emissão de fótons e  $E_i$  a energia do fóton para a emissão  $i^{\text{th}}$  no decaimento do Tl-201, somado para todas as emissões de fótons.  $\Gamma_{\delta}$  foi calculado usando dados de coeficiente mássico de transferência de energia no ar e dados da taxa de emissão no processo de decaimento do nuclídeo Tl-201. O subscrito  $\delta$  implica que apenas fótons cuja energia é superior a 10 keV são incluídos no cálculo.

## 6.2 Resultados

Os tecidos do modelo de voxel do coração foram previamente inseridos na base de dados do SISCODES. A tabela 2 mostra algumas características dos tecidos usados no modelo, tais como sua densidade de massa e sua porcentagem em peso de produtos químicos.

Tabela 2 – Composição química e densidade de cada tecido presente no modelo voxel.

Tecidos	densidade (g/cm <sup>3</sup> )	composição química (Concentração em % de massa)											
		Ar	C	Ca	Cl	Fe	H	K	N	Na	O	P	S
Aorta	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Aorta ascendente	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Aorta descendente	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Ar	1.20x10 <sup>-3</sup>	0.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	78.12	0.00	20.95	0.00	0.00
Artérias	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Carótida	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Artéria Pulmonar Artéria	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Artéria Subclávia	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Átrio	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Brônquio principal direito	0.30	0.00	9.90	0.00	0.30	0.00	9.60	0.00	2.20	0.50	74.40	2.20	0.90
Brônquio principal esquerdo	0.30	0.00	9.90	0.00	0.30	0.00	9.60	0.00	2.20	0.50	74.40	2.20	0.90
Calcificações	1.00	0.00	0.00	39.90	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	41.40	18.50	0.00
Coronárias	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Esôfago	1.05	0.00	11.50	0.00	0.20	0.00	10.60	0.10	2.20	0.10	75.10	0.10	0.10
Fígado	1.06	0.00	13.90	0.00	0.20	0.00	10.20	0.30	3.00	0.10	75.10	0.10	0.10
Músculo Cardíaco	1.04	0.00	14.30	0.00	0.10	0.00	10.20	0.40	0.00	0.10	71.00	0.20	0.30
Músculo esquelético	1.05	0.00	14.30	0.00	0.10	0.00	10.20	0.40	0.00	0.10	71.00	0.20	0.30
Corpo ósseo vertebral	1.18	0.00	0.00	39.90	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	41.40	18.50	0.00
Costela	3.20	0.00	0.00	39.90	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	41.40	18.50	0.00
Esterno	1.10	0.00	41.50	0.00	0.20	0.00	10.50	0.20	3.40	0.00	43.90	0.10	0.20
Pele	1.00	0.00	20.40	0.00	0.30	0.00	10.00	0.10	4.20	0.20	64.50	0.10	0.20
Pulmão	0.26	0.00	10.50	0.00	0.30	0.00	10.30	0.20	3.10	0.20	74.90	0.20	0.30
Tecido Adiposo	0.95	0.00	59.80	0.00	0.10	0.00	11.40	0.00	0.70	0.00	0.00	27.80	0.10
Traqueia	1.10	0.00	9.90	0.00	0.30	0.00	9.60	0.00	2.20	0.50	74.40	2.20	0.90
Veia cava inferior	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Veia cava superior	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Veia pulmonar direita	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Veia pulmonar esquerda	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Veia hepática	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.00	10.20	0.00	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20
Ventrículos	1.06	0.00	11.00	0.00	0.30	0.10	10.20	0.20	3.30	0.10	74.50	0.10	0.20

A figura 18 mostra respectivamente, imagem da tomografia cardíaca, simulação de dose absorvida em modelo de voxel do coração em duas e três dimensões. Nessa estão apresentadas algumas seções do modelo de voxel do coração no plano XY vistos pela interface SOFT-RT do SISCODES, interface utilizada para representação tridimensional dos modelos de voxels, em três perspectivas diferentes.

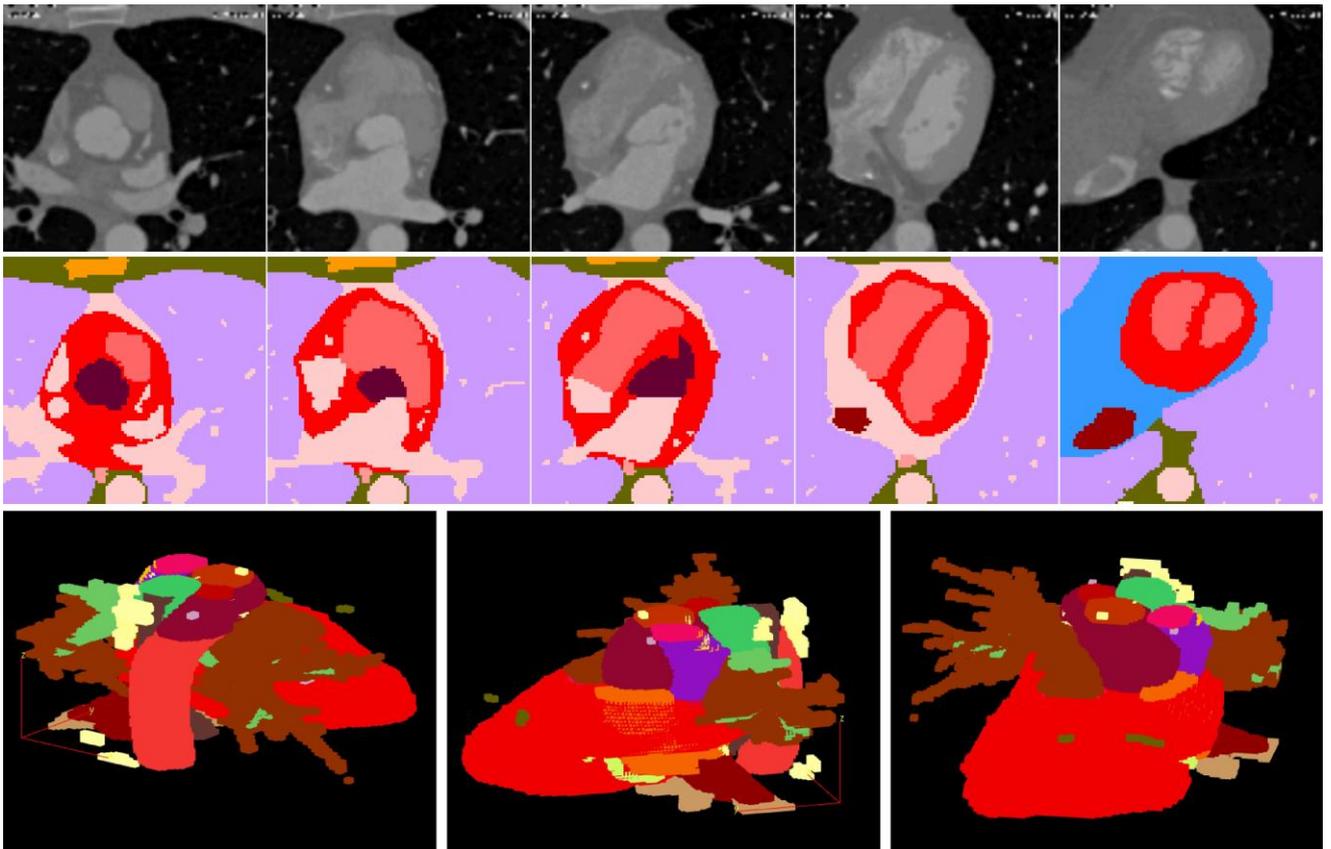


Figura 18. Imagens de tomografia do coração, modelo em voxel SISCODES e interface SOFT-RT em três dimensões, respectivamente.

A figura 19 apresenta a legenda utilizada com as cores e seus respectivos tecidos.



Figura 19. Legenda das cores e respectivos tecidos.

Na figura 20 está representado o modelo em voxel que foi exportado do SISCODES para o MCNP5, no qual foram realizadas as simulações, como mostra as secções nos posicionamentos axial, sagital e coronal.



Figura 20. Seções do modelo de voxel do coração na interface do MCNP5.

O percentual de dose absorvida representada por curvas de isodose, na figura 21, teve como referência o valor máximo de  $2,11 \times 10^{-11}$  Gy por radionuclídeo. Todos os valores são normalizados ao valor máximo. Uma tabela correlaciona cor e tecido, bem como os intervalos de dose normalizados atribuídos a cada cor foram escolhidos para gerar imagens similares a aquelas obtidas a partir das imagens do miocárdio com SPECT.

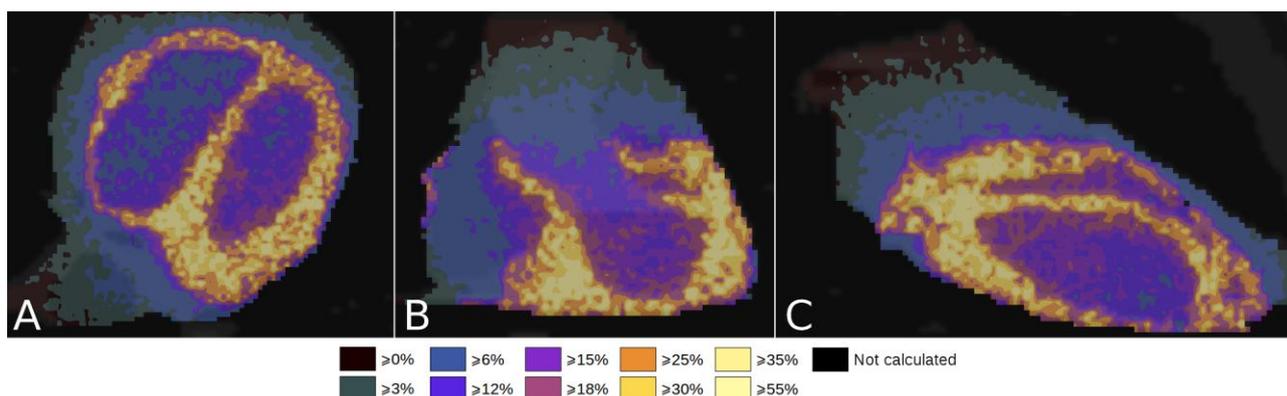


Figura 21. Porcentagem em áreas de isodose dos valores de distribuição nas seções do coração

A Figura 22 apresenta os resultados de dose no miocárdio tomados em diferentes seções do modelo. Nesta mesma figura, em vistas similares, estão as distribuições de dose em graus de cinza, sendo que neste caso o valor máximo é assumido em cor branca e o mínimo em preto.

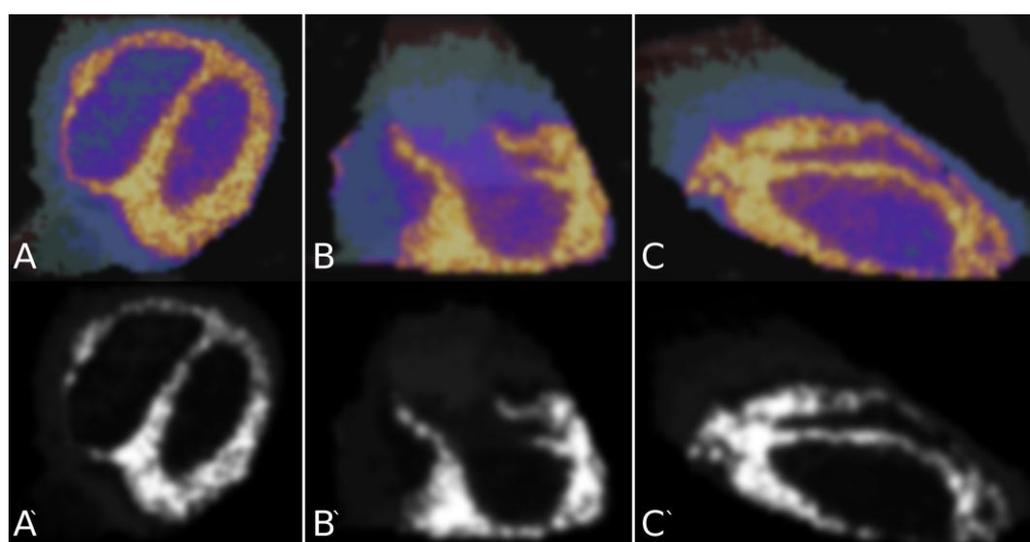


Figura 22. Imagem do coração depois do filtro e convertida a escalas de cinza com contraste.

Para obter a dose transmitida a equação (5) foi aplicada. O  $C0$ ,  $C1$ ,  $C2$ ,  $C3$  na equação (6) foram obtidos por ajustes de dados experimentais não linear em função do tempo de captação do coração, apresentado por Bradley-Moore et al. (1974). Esses dados são mostrados na tabela 3.

Tabela 3 – Dados experimentais de Bradley-Moore et al. (1974), da captação cardíaca do tálio em função do tempo.

<b>Tempo após injeção tálio (s)</b>	<b>Captação do coração (% de atividade injetada)</b>
600	3,65
1500	3,70
6300	3,00
7800	2,96
72000	0,58
230400	0,27
604800	0,08

Os valores obtidos foram:  $C0 = 3,322053$ ;  $C1 = 17637,7$ ;  $C2 = 0,479739$  e  $C3 = 252497$ . Então a dose transmitida sobre esse procedimento foi avaliada como se segue:

$$D = r A \frac{1}{100} \int_{t_i}^{t_f} 3.32053e^{\left(\frac{-\ln(2)t}{17637.7}\right)} + 0.479739e^{\left(\frac{-\ln(2)t}{252497}\right)} dt \quad (11)$$

O termo  $100^{-1}$  existe porque os dados experimentais foram expressos em percentual total de atividade injetado. Os limites da integral  $t_i$  e  $t_f$  são  $t_i = 0$  s no momento da injeção do  $^{201}\text{Tl}$ , e  $t_f = 2624832$  s correspondendo a dez meia-vidas do  $^{201}\text{Tl}$ . O resultado da integral foi de 259121,36 s.

Como mostrado na figura 21, às curvas de isodose são dispersas no músculo cardíaco dificultando a interpretação, dessa forma foi importante à construção de um histograma dose versus volume.

A figura 23 representa o histograma da relação entre dose absorvida para o percentual de volume, considerando uma injeção de 148 MBq (4 mCi) de  $^{201}\text{Tl}$ . Pode-se ver que, quase 100% do volume do coração recebe pelo menos 0,1 mGy; sendo que, 90% do músculo cardíaco e 75% da artéria coronária recebem cerca de 0,4 mGy; bem como, 70% do músculo cardíaco e 55% da artéria coronária recebem cerca de 0,6 mGy, e menos que 10% do músculo cardíaco e 5% da artéria coronária recebem dose maior que 1 mGy.

O ponto máximo da dose absorvida pelo músculo cardíaco foi de 2,64 mGy e o ponto máximo da dose absorvida para a artéria coronária foi de 1,23 mGy. E quando comparado, observa-se que, o músculo cardíaco recebeu maior dose do que a artéria coronária.

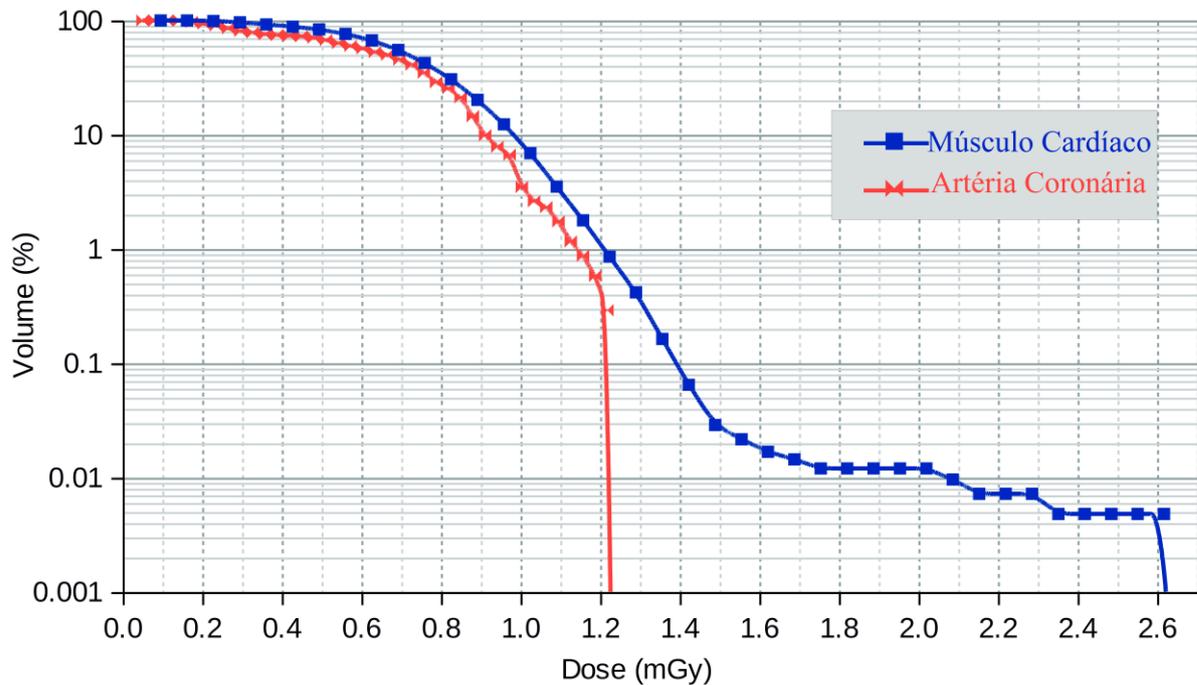


Figura 23. Histograma da relação entre dose absorvida e porcentagem em volume

### Validação

O coração foi representado por uma esfera de tecido de raio de 4,5 cm e massa de 0,4 kg com o radionuclídeo tálio distribuído de maneira homogênea. O coeficiente de atenuação de massa ( $\mu/\rho$ ) é de  $0,0280 \text{ cm}^2\text{g}^{-1}$  a 70 keV, com percentual de emissão gama máximo de 37%, e músculo cardíaco com densidade mássica  $\rho$  de  $1,05 \text{ g.cm}^{-3}$ . Da equação 10, a constante

específica  $\Gamma$  para o  $^{201}\text{Tl}$  foi  $4,7 \text{ Rh}^{-1}\text{mCi}$  a  $1 \text{ cm}$ , onde o coeficiente de absorção da energia do músculo cardíaco,  $\mu$ , foi de  $0,0294 \text{ cm}^{-1}$  e o fator  $S$ , equação 8, foi de  $52,97 \text{ cm}$ .

Portanto, de acordo com a equação 7, a taxa de dose (DR) foi avaliado multiplicando:  $4,7 \text{ R.cm}^2.\text{h}^{-1}.\text{mCi}^{-1}$ ,  $52,97 \text{ cm}$  e  $0,0003877 \text{ mCi.cm}^{-3}$ , o que significa (DR) de  $0,09657 \text{ R.h}^{-1}$ . A fim de converter unidade (DR) ou taxa de dose para  $\text{Gy}$ , a relação  $\text{R/Gy}$  igual a  $0,00877$  foi aplicada. Então, (DR) foi de  $0,0008469 \text{ Gy.h}^{-1}$ .

A dose transmitida  $D$  pode ser encontrada multiplicando  $DR$  pelo fator tempo integral, como mostra a equação 5. Representando  $3,7\%$  da captação do coração referente à atividade injetada de  $148 \text{ MBq}$ , o equivalente a  $4 \text{ mCi}$ . A dose  $D$  pode ser encontrada multiplicando  $0,0008469 \text{ Gy.h}^{-1}$  por  $2591,2136 \text{ s}$  e pelo fator de conversão de  $\text{h.3600}^{-1}.\text{s}^{-1}$  fornecendo  $0,6095 \text{ mGy}$  da dose transmitida.

Dessa forma, obtendo a dose por cálculo analítico de  $0,6095 \text{ mGy}$ . E pelo histograma a dose para  $50\%$  do volume cardíaco tomado no modelo de voxel do coração foi de  $0,670 \text{ mGy}$ . Esses valores estão na mesma ordem de grandeza e diferenciam em  $9\%$ .

### 6.3 Discussão

O Comitê MIRD desenvolve métodos padronizados, modelos, hipóteses e esquemas matemáticos para avaliar doses internas de radiação de radiofármacos administrados. A abordagem MIRD simplifica o problema da dose para avaliar diversos radionuclídeos, cada um com as suas características e propriedades radiológicas químicas, como compostos relacionados ao ambiente biológico, que são altamente diversificados, representado pelo corpo humano, os órgãos internos, os tecidos e os compartimentos de fluidos diferentes. A virtude da abordagem MIRD é que ela reduz sistematicamente análises complexas de dosimetria com métodos que são relativamente simples de utilizar, incluindo ferramentas de software para utilização experimental e clínica (SNYDER et al., 1975). A Comissão Internacional de Proteção radiológica – ICRP adaptou cada metodologia seguindo referência semelhante (ICRP, 1983).

O esquema MIRD adaptou o modelo antropomórfico adulto de 70 kg e dosimetria realizada multiplicando absorção e transmitindo fatores para cada órgão e tipo de radionuclídeo, que é proporcional a função de captação de acordo com o objetivo estabelecido e fonte. MIRDOSE (STABIN, 1996), DOSCAL (SGOUROS et al., 1988), MABDOS (JOHNSON et al., 1999), são softwares que auxiliam na aplicação do método MIRD em medicina nuclear. Esse método fornece uma média da dose equivalente no órgão alvo, não se refere à dose máxima.

Neste caso, a distribuição da dose espacial pode ser conseguida pela simulação do modelo de voxel, discriminando a dose em outra parte específica de cada órgão, como artéria coronária, por exemplo. Cada melhoria pode contribuir para especificar o efeito determinístico da radiação no músculo cardíaco, especialmente em relação à modulação da matriz metaloproteinases – MMPs, proteínas ativadas por proteases contidas nos mastócitos. Segundo Boerma et al. (2010), os mastócitos podem estar relacionados diretamente as doenças cardíacas induzidas por radiação.

Atkins et al. (1977) e Krahwinkel et al. (1988) forneceram o máximo de captação do  $^{201}\text{Tl}$  em órgão humano, apresentando 0,15% – 3% da atividade administrada. Entretanto, Gupta et al. (1981) e Hosain (1981) demonstraram altos valores para captação testicular até 14h de 0,8%-1%. Essas altas doses resultaram em maior preocupação com indivíduos mais jovens, sobre

aplicações do  $^{201}\text{Tl}$ . Em futuro próximo, o presente modelo poderá ser aplicado para validar tais resultados.

Em relação à imagem, radionuclídeos contaminantes como o  $^{200}\text{Tl}$ ,  $^{202}\text{Tl}$  e  $^{203}\text{Pb}$  podem oferecer preocupação. Porém, os mesmos contribuem pouco à dose transmitida ao coração, sendo 1% para o  $^{200}\text{Tl}$  e  $^{202}\text{Tl}$  e 0,1% para  $^{203}\text{Pb}$ . Portanto, esses contaminantes não foram incluídos neste estudo.

O esquema MIRD apresenta a dose efetiva em Sievert – Sv, e é seguido por vários autores. Assim, por esse método, a parede do coração apresenta 0,23 mSv, 0,28mSv e 0,25 mSv de acordo com ICRP (1988), Radiation Internal Dose Information Center – RIDIC e Thomas et al. (2005).

Os presentes cálculos forneceram as doses transmitidas em unidade de Gray - Gy. Não foi avaliada a dose efetiva em unidade de Sievert - Sv. Nesse caso, em Sv, são utilizados fatores de ponderação. Já o presente estudo não gerou a média de dose no órgão específico, mas a distribuição espacial da dose absorvida pelo miocárdio, devido à atividade da fonte nesse órgão. Tal estudo deve contribuir para elucidar a dose nesse tecido e sua relação com possíveis efeitos determinísticos. Em trabalhos futuros pode-se adicionar a contribuição da dose devido à contribuição da captação em outros órgãos.

De acordo com Einstein et al. (2010), altas doses efetivas cumulativas estimada para vários pacientes submetidos a cintilografia de perfusão do miocárdio são relevantes a nível radiológico, especialmente para pacientes que devem repetir o exame. Mais de 30% dos pacientes recebem uma dose acumulativa estimada em 100 mSv de dose efetiva. A média cumulativa estimada de dose efetiva para exame de cintilografia de perfusão do miocárdio é de 28,9 mSv (IQR 27,9 – 55,6 mSv; significa [média], 44,6 [6,5-406,9]mSv).

Esses altos valores de doses cumulativas podem trazer preocupação para os riscos estocásticos, o que significa que em um só evento de radiação, sem limiar de dose definido, é suficiente para produzir dano irreparável. A presente metodologia lida com a avaliação da dose absorvida no miocárdio por voxels. Com efeito, o método proporciona esse estudo

discriminado espacialmente no miocárdio, que pode ser correlacionada com a dose efetiva média no órgão.

De acordo com Boerma e Hauer-Jensen (2011), Filopei e Frishman (2012), Boerm et al. (2005), Lee e Mallik (2005), Giraud e Cosset (2004), Veinot e Edwards (1996), a doença cardíaca induzida por radiação – RIHD (do inglês, *Radiation-Induced Heart Disease*), é considerada um efeito colateral grave, quando o coração encontra-se exposto totalmente ou parte dele no campo de radiação em radioterapia de tumores de parede torácica e peito. Os efeitos incluem aterosclerose acelerada, fibrose do pericárdio e miocárdio, anormalidades de condução e lesões nas válvulas cardíacas. Esses podem ser observados anos depois da irradiação e não existe um método para prevenir ou reverter os danos causados nesse coração pela radiação ionizante.

A cintilografia de perfusão do miocárdio pode não ser um indutor em potencial dos efeitos induzidos pela radiação, mas, contudo radiação ionizante em doses pequenas é responsável por redução microscópica da densidade de capilares do miocárdio, aumento da atividade da matriz das metaloproteinases, degradação do colágeno intersticial e disfunção do sistema endotelial (SCHARPFENECKER et al., 2009).

Boerma e Hauer-Jensen (2010), verificaram alterações em modificadores de lesão endotelial, o TGF- $\beta$  (do inglês, *transforming growth factor – beta*), o RAS (do inglês, *renin angiotensin system*), nervos sensoriais cardíacos e sistema endotelina, que são os peptídeos responsáveis por promover constrição dos vasos sanguíneos e aumento de pressão arterial. Alterações que podem contribuir para as manifestações da RIHD, ou doenças do coração induzidas por radiação, como citadas anteriormente.

Toledo et al. (2013), realizaram estudo de investigação de parâmetros fenotípicos de marcadores celulares induzidos por radiação em modelo animal, analisados por citometria de fluxo, concluindo com importantes observações sobre a capacidade da radiação em induzir diferenças fenotípicas entre linhagem de linfócitos, redução da subpopulação de células T CD5 e CD4 com aumento da expressão de CTLA-4. Demonstrando a relevância de se investigar e avaliar os efeitos determinísticos da radiação.

A discussão apresentada corrobora os dados obtidos nos resultados desse trabalho. Confirmando a importância de pesquisas realizadas com o objetivo de melhor compreender os efeitos determinísticos associados às doses absorvidas, quando um indivíduo é submetido ao exame de cintilografia de perfusão do miocárdio.

## **7 PHENOTYPIC BEHAVIOR OF PBMC FROM IRRADIATED DOGS BASED ON FLOW CYTOMETRY**

(Artigo publicado em *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*. Vol.27, n.2, p.309-317, 2013.)

The present paper investigates the phenotypic parameters of stimulation markers and cell immunosuppression markers in an animal model using flow cytometry analysis. Six dogs were exposed to 2, 4 or 6 Gy following a head and neck protocol. Samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected before irradiation, representing standard values for all dogs (control), and at 2 h, 18 h and 30d after irradiation. Such samples were separately assessed for surface markers with the monoclonal antibodies anti-CD5, anti-CD4 and anti-CTLA-4 by flow cytometry. A reduction in Tcell expression of CD5 and in the subpopulation expressing CD4 and an increase in CTLA-4 expression were found. No statistically significant differences were observed for the absorbed dose grouping, although the time kinetics was recorded. Radiation induced phenotypic differences between the lymphocyte lineages, reducing the CD5 and CD4 Tcell subpopulations and increasing CTLA-4 expression. The findings demonstrate the relevance of investigating the immunophenotype of irradiated subjects by examining the peripheral cell lineage.

### **7.1 Introduction**

Immunophenotypic characterization has been the leading method for the determination of cell lineages and of the degree of maturation under hematological conditions. The development of a large spectrum of monoclonal antibodies and the enhancement of flow cytometry techniques have occurred over the past 20 years, making the recognition of these cell lineages possible. Flow cytometry can recognize phenotypic, biochemical and molecular differences between cells (ALICE, 2001).

Ionizing radiation can produce structural changes in subsets of cells. Radiation can promote genetic changes that stimulate cytokines and growth factors that act on tissues. Radiation may also change the phenotype of circulating lymphocytes (KURUDIREK, et al. 2011).

Applied flow cytometry is a quantitative and sensitive method to evaluate apoptosis induced by low-dose radiation *in vitro* in human peripheral blood lymphocytes. The time kinetics of apoptosis were investigated and showed a statistically significant difference between control and irradiated samples. Such a study illustrates the high sensitivity of the flow cytometry method when applied to irradiated cells (HERTVELDT et al., 1997; LOUAGIE et al., 1998). Additionally, the pro inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 may be involved in the inflammatory response of the vascular endothelium to exposure to ionizing radiation (MEEKEN et al., 1997).

Further developments in flow cytometry assays, either alone or in combination, have led to the definition of readily measurable cytometric parameters that are useful as predictive markers for cellular responses to DNA-damaging agents (WILLIAM et al., 2001). The most relevant cytometric methods currently used to analyze ionizing radiation effects were previously discussed (BAATOUT et al., 2004). Particular attention has been devoted to the following methods: the chromosomal aberration assay, the micronucleus assay, fluorescence *in situ* hybridization chromosome painting, the comet assay, the comet-FISH assay and flow cytometry (BAATOUT et al., 2004).

cDNA microarray hybridization technology has been used to monitor the transcriptional response of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to X-ray doses ranging from 2 to 200 cGy (LANZA et al., 2005). The results confirmed the physiological relevance of sub lethal dose exposures to endothelial cells and strengthened the hypothesis that alternative dose-specific pathways for radio adaptive responses exist in mammalian cells (LANZA et al., 2005).

A simplified quantitative flow cytometry method to measure IR-induced  $\gamma$ -H2AX in cells was developed (KATAOKA et al., 2006). The method's results demonstrated a strong correlation with values obtained by a standard automated digital microscopic-foci analysis along with NIH Image J custom macro software (KATAOKA et al., 2006).

Additionally, it was observed that the inhibition of Mac-1 increases tumor responses to radiation, reducing the recruitment of myeloid cells. Such results support the use of antibodies as an adjunctive therapy to radiation therapy (AHN G-O et al., 2010).

Ionizing radiation changes microRNA (miRNA) levels in human endothelial cells and also exerts biological effects on cell growth and clonogenicity (MECHTHILD W-E et al., 2010). Data also suggest that miRNAs, which are differentially expressed after irradiation, modulate the intrinsic radiosensitivity of endothelial cells during subsequent irradiations. This finding indicates that miRNAs are part of the innate response of the endothelium to radiation (MECHTHILD W-E et al., 2010).

Ionizing radiation induced significant changes in the miRNA expression profiles of three types of gliomas and three squamous carcinoma cell lines (NIEMOELLER et al., 2011). The functional relevance of these changes has not been addressed but should be analyzed in future work, especially focusing on clinically relevant endpoints, such as radiation-induced cell death, proliferation, migration and metastasis (NIEMOELLER et al., 2011).

A canine model has been applied to mimic and investigate the human immunesystem, musculoskeletal system and nerve system and human molecular genetics and oncology (BAUER et al., 2004; BETHGE et al.; 2003, CHRISTOPHER et al.; 2004, AKHTAR et al.; 2004). A dog model has been applied to study radioimmunotherapy (BETHGE et al., 2003) and organ transplantation modulated by irradiation (SHENGWU et al., 2007), but no radiation therapy protocols have been investigated in a canine model. There is no knowledge of the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) responses to small-field and low-dose radiations in a dog model, similar to radiation therapy protocols in human. Head and neck radiation therapy addresses various geometric and radiation physical parameters that cannot be reproduced in a small-sized animal model, such as a rat or mouse model. A field size of 5x5 cm to 15x15cm or a similar size, with a deep dose at 5 to 15 mm (electronic equilibrium), provides a stable and reproducible irradiation field. A small size with a shallow deep dose is impractical in mice when focusing on the head and neck, for example.

The present paper investigates the phenotypic parameters of stimulation markers and cell immunosuppression markers in an animal model by flow cytometry, focusing on

morphological cell changes and functional alterations in the immune system.

## 7.2 Methods and Materials

A group of six dogs was selected based on their small size and male sex, with weight 8,2; 8,0; 9,1; 7,5; 8,5; 9,2 kg; and *cernelha* height of 33; 35; 34; 28; 32; 35 cm, respectively. The animals were maintained without restricting water and nutrition. The experiment was approved by the Ethical Commission of Animal Experimentation – CEEA of CPPPA, Medical Science School of Minas Gerais, protocol 001/2006. The irradiation protocol was performed using Theratron-80 equipment cobalt-60 (Co-60), portal size of 13 x 17 cm<sup>2</sup> and treatment depth of 2,5cm at the head and neck site) with eye protection and weekly dosages of 2Gy. Figure 24 provides a representative image of the irradiation area, addressing the irradiation window and the protective area. The total absorbed dose received by the dogs was as follows: 2, 4 or 6Gy. A time kinetics table was adopted, in which T0 represents the time before irradiation, which is a standard value for all dogs (control); T2 represents 2 h after irradiation; T18 represents 18 h after irradiation; and T30 represents 30 days after irradiation.

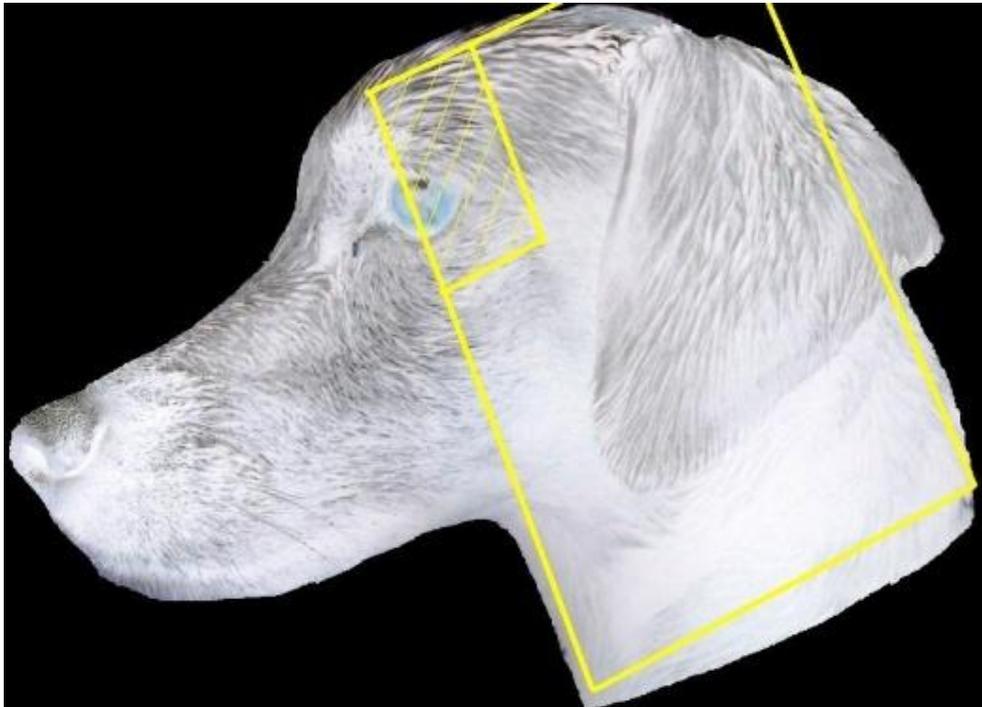


Figure 24 – Representative image of the irradiation area, depicting a window of 13cm x 17cm with eye protection and including the entire head and neck.

Anesthesia was intramuscularly administered to the subjects at the time of each irradiation with 5 mg/kg Dopalen® (ketamine) and 2 mg/kg Rompum® (xylazine). Blood collection was performed under anesthesia. The right femoral artery was punctured with a 25 x 7 mm needle mounted on a disposable 20 mL syringe, so that 8 to 10 mL of blood was obtained each time. Peripheral blood samples were collected before irradiation (T0) and 2 h (T2), 18 h (T18) and 30 days (T30) after irradiation. The PBMCs were separated and submitted to labeling with the monoclonal antibodies anti-CD5, anti-CD4 and anti-CTLA-4 to evaluate the circulating T cells, B cells and monocyte/macrophage lineage cells; the stimulation parameters; clonal expansion; and the regulation of clonal expansion. The individual markers chosen in this study (cell activation, immunosuppression and apoptosis) were analyzed by flow cytometry, giving a precise count of the subsets of lymphocytes according to time kinetics.

The PBMCs were sorted following a procedure described by (GAZZINELLI et al., 1983) heparinized blood was drawn in 50 mL tubes containing a mixture of Ficoll-diatrizoate (one part Ficoll-diatrizoate and two parts blood). The mixture was centrifuged for 40 min at 400x g at room temperature. After centrifugation, a ring of mononuclear cells was obtained at the interface of the Ficoll and the plasma, which was carefully removed with the aid of a Pasteur pipette and transferred into sterile conical 50 mL tubes. These tubes were filled with up to 50 mL of Minimum Essential Medium (MEM) and centrifuged for 10 min at 400 x g and 4 °C. The cells were washed twice with 30 mL of MEM. Finally, the cells were suspended in 2 mL of culture RPMI-1640 (GIBCO). A small amount of the cell suspension was fractionated (1:20) in Turck's solution, and the number of cells was determined by counting the cells in a Neubauer chamber with the aid of an optical microscope. The concentration of cells was adjusted to  $10 \times 10^6$  cells/mL RPMI-1640 suspensions. All cells were manipulated under sterile conditions in a laminar flow chamber.

The *ex vivo* immunofluorescence assays for the PBMCs followed the Becton Dickinson® protocol, adapted to a 96-well plate. A volume of 25 µL of a specific monoclonal antibody against a cell receptor of interest was added to 96-well plates, labeled with fluorochrome and fractionated 1:5 in flow cytometry buffer (PBS with 1% BSA, pH 7.4). In total, 25 µL of mononuclear cells were assessed in each assay, corresponding to 250,000 cells per well. The plates were incubated for 20 to 30 min at 4 °C away from light. The samples were washed

once with 200  $\mu$ L of 0,015 M PBS, pH 7.4, by centrifugation at 1,300 rpm for 7 min at 4 °C, after which the supernatant was discarded. The samples were fixed in 200  $\mu$ L of fixing solution (10 g/L formaldehyde, 1% sodium cacodylate and 6,67 g/L sodium chlorite, pH 7.2). After 30 min at 4 °C, the set of samples were transferred, in triplicate, to 1 mL tubes, and the phenotypic parameters of the cells present in each sample were determined with the aid of a flow cytometer. The identification of the types and percentages of the cell populations and subpopulations and the costimulatory molecule expression on these cells was performed using CellQuest software on a computer attached to the cytometer. The monoclonal antibodies used in the study were as follows: CD4 (antigen), canine CD4 (antibody specificity), 1:100 (dilution), ratIgG2 (isotype), Abcam (source); CD5 (antigen), humanCD5 (antibody specificity), 1:100 (dilution), rat [53-7,3] (isotype), and Abcam (source); and CD154 (antigen), human CTLA-4 but also reactive with canine (antibody specificity), 1:100 (dilution).

### **7.3 Results**

The following alterations were observed: a reduction in the circulating Tcells expressing CD5, a reduction in the subpopulation expressing CD4 and an increase in CTLA-4 expression. The findings proved that the function of peripheral circulating cells is redefined during *in-locus* irradiation. Initial results showed no statistically significant differences for the absorbed dose grouping. Therefore, results are not presented on dose kinetic strength but on time kinetics because it was possible to record the times of changes in the evaluated cellular receptors.

A phenotypic analysis of T lymphocytes was performed with an anti-CD5 monoclonal antibody. Figures 25 and 26 present the percentages of CD5+ lymphocytes in the total lymphocyte population in the dogs' peripheral blood samples before and after irradiation. A statistical analysis of the results showed a statistically significant difference between the percentages before (0 h, control) and after irradiation for the timetables analyzed (2 h, 18 h and 30 d) but not between the 2, 4 and 6 Gy dosages, so the dose results were grouped. The data include three points for dose and four points for time in the six subjects. The number of subjects was defined by a Student's t-test, which showed an adequate statistically significant difference in the time profile. The percentage of CD5+ T lymphocytes was lower after 18 h than 2 h and 30 d after irradiation.

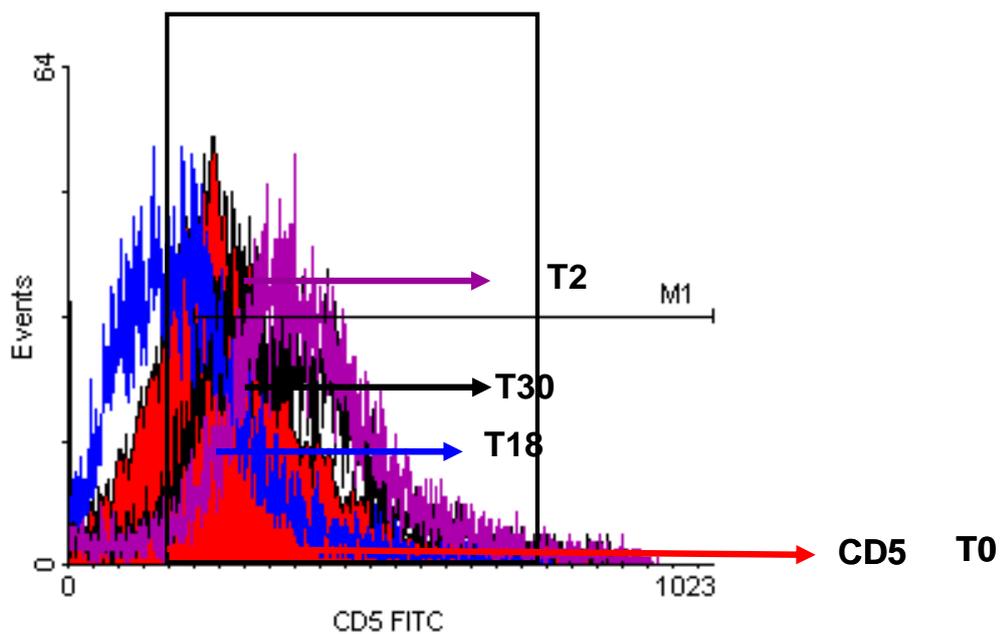


Figure 25. Histogram of the fluorescence intensity evaluated through a medium channel tested in a fluorescence channel that goes from 0 to 1023, to the absolute number of CD5 receptor, at the time of 0 h (control), 2 h, 18 h and 30 d after cobalt 60 radiation, considering positive the values from channel 200 (from M1). The picks were represented by: 2 h -T2, 18 h-T18 and 30 d-T30. The pick marking at time T0 represents the total CD5+ T cells.

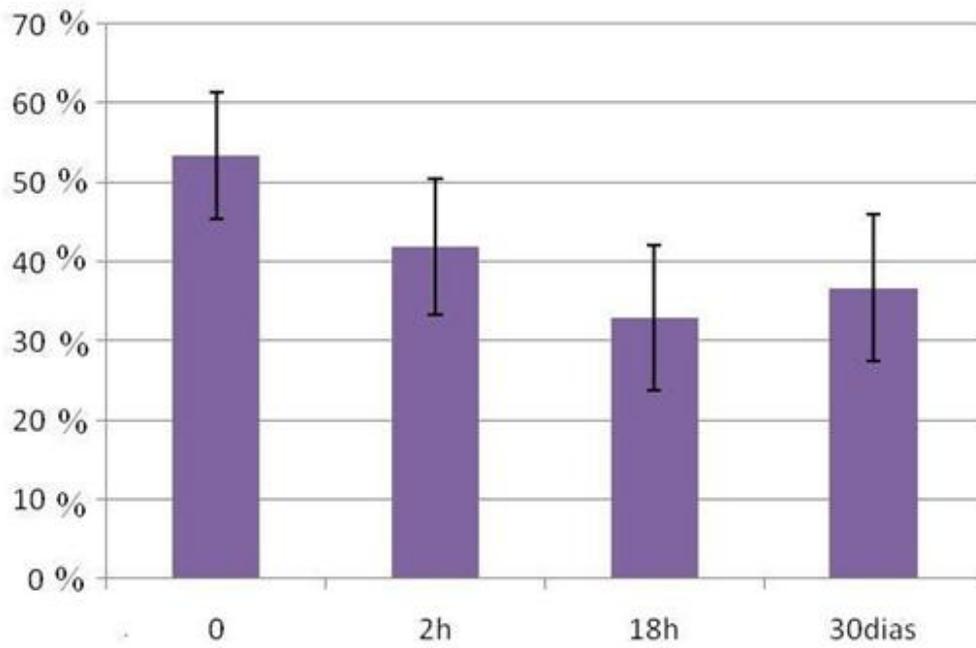


Figure 26. Mean Percentage of CD5+ cells in circulating lymphocytes of radiated dogs. The moments of the experiment are represented by Time 0 (zero), 2 hours and 18 hours post radiation with cobalt 60 on the predicted doses and after 30 days of radiation. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in relation to time zero were found. The statistic method used – ANOVA followed by t-student test.

Figures 27 and 28 present the percentages of CD4+ T cells in the total population of circulating lymphocytes before (control) and after irradiation. A statistical analysis of the results showed a reduction in the population 2 h after irradiation ( $26.67 \pm 4.23$  cells) compared with time zero ( $36.65 \pm 2.56$  cells). The percentage reduction was significant ( $p < 0.05$ ) at 18 h, with a mean T cell count of  $12.45 \pm 2.95$ , which indicates the cumulative absorbed dose effects of the gamma radiation. This reduction remained even 30 days after irradiation.

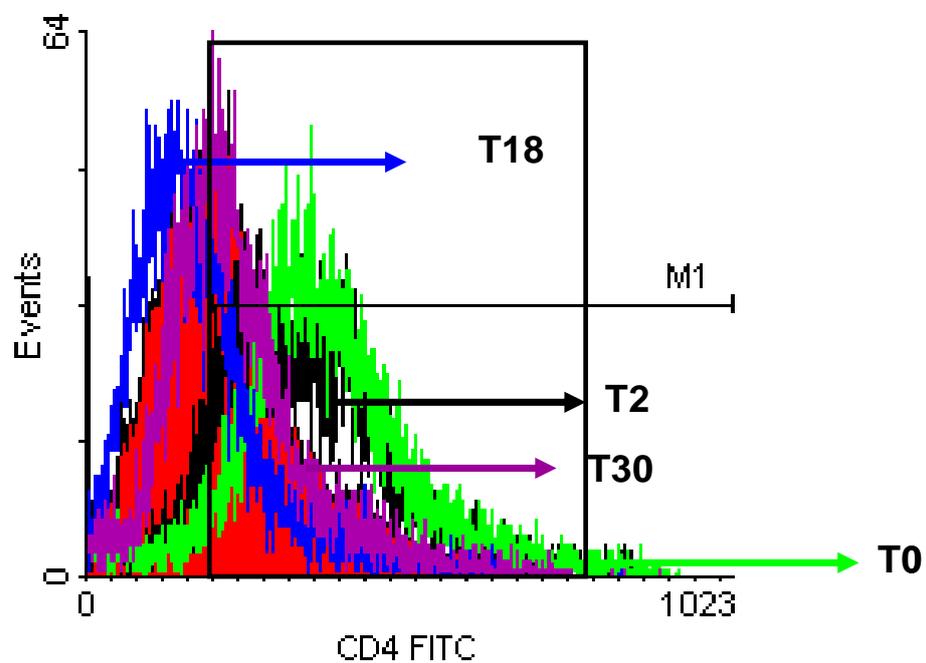


Figure 27. Histogram of fluorescence intensity evaluated in a mean fluorescence channel that varies from 0 to 1023, for the absolute number of CD4+ receptors, at a time kinetics of 0 (control), 2 and 18 h and 30 d post radiation with gamma rays (cobalt 60), considering the positive values beginning at channel 200 (starting from M1). The pick was represented by: time zero –T0; 2 h – T2, 18 h – T18 and 30 d – T30, and the pick represents the total T cells marking co-expressing over the CD4+ receptor on the mentioned times.

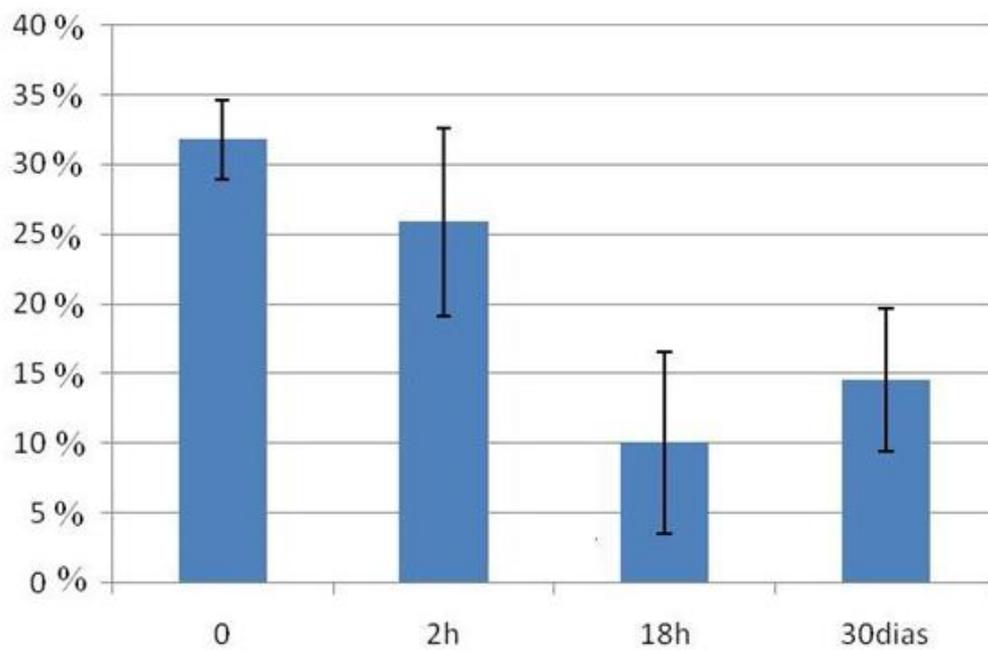


Figure 28. Mean percentage of CD4+ Lymphocytes in radiated dog's lymphocytes. The steps of the experiment are represented by Time 0 (zero), 2 and 18 hours post radiation and after thirty days of radiation. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in relation to time 0. The statistic method used was ANOVA followed by t-student test.

Figures 29 and 30 shows the absolute numbers and the percentages of CTLA-4 receptors in the total lymphocyte population in the peripheral blood of dogs before and after irradiation. Statistical analyses of the results showed a statistically significant difference before and after irradiation, corresponding to the evaluated times of 2 h, 18 h and 30 d. The ratio of the percentages of CD5+ T lymphocytes that co-expressed the CTLA-4 receptor was already significantly higher at the first 2 h after irradiation compared with time zero (control), with a peak at 18 h for the corresponding doses.

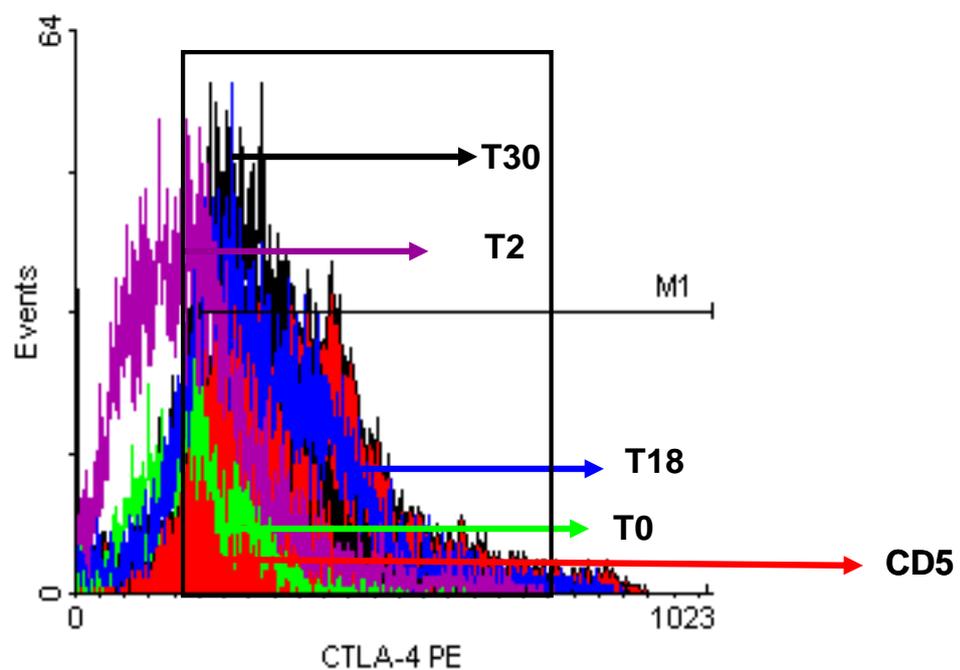


Figure. 29. Histogram of the fluorescence intensity evaluated in a mean channel that goes from 0 to 1023, for the absolute number of CTLA-4 receptors, at a time kinetic of 0 (control), 2 and 18 h and 30 d after radiation with cobalt 60, considering the positive values starting at channel 200 (from M1). The picks were represented by: time zero – T0; 2 h – T2, 18 h – T18 and 30 d – T30. And the pick represents the total T cell marking co-expressing over the CTLA-4 receptor in the selected times.

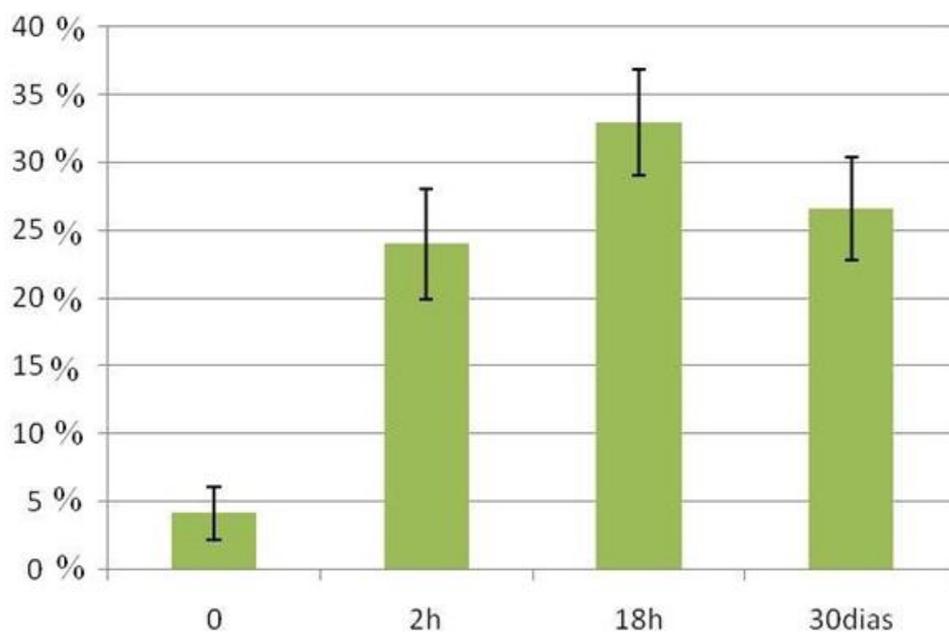


Figure 30. Mean percentage of CTLA-4 Lymphocytes between radiated dog's CD5+ lymphocytes. The steps of the experiment were represented at time 0 (control), 2, 18 h and 30 d post radiation. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found in relation to time zero. The statistic method used was ANOVA followed by t-student test.

## 7.4 Discussion

The investigated immune cells were bone marrow-derived PBMCs. Many of those cells are mature and migrate as a function of the stimulus level. In the case of PBMCs, one particular class originates from a common lymphoid progenitor, which gives rise to T and B lymphocytes. When lymphocytes are activated in response to radiation stimuli, the cells differentiate into antibody-secreting plasma cells (B lymphocytes) and T cells. The T cells are endowed with surface receptors that respond to specific monoclonal antibodies, as in the case of CD8+ T lymphocytes, which kill target cells, and CD4+ T cells, which are able to activate B lymphocytes (FALCÃO et al., 2013).

It is worth mentioning that to perform their protective function properly when responding to exogenous stimuli (in this case, radiation), multiple T cell clones with a wide diversity of antigen recognition undergoes a rigorous selection process and thymic maturation. This process occurs through the recognition of self-peptides bound to major histocompatibility

complex (MHC) molecules. The ability to distinguish between self-antigens and non-self is defined as immunological tolerance and is essential to avoid self-recognition, which, when exacerbated, can cause pathological autoimmune responses. Considering the efficiency of this selection process, PBMC behavior should reflect radiation kinetics. Such behavior has been detected using monoclonal antibodies against surface receptors, demonstrating that behavioral alterations are indeed produced as a function of radiation stimuli (FALCÃO et al., 2013; CALVERT et al., 1988).

The functions that CD5 has in irradiated T cells is not yet clear, but CD5 has been associated with a direct co-signaling role in activation or a co stimulatory role, along with CD2, CD4, CD6 and CD28, in humans (MOORE et al., 1992). This receptor may be responsible for intracellular  $Ca^{2+}$  uptake, increased mitosis or the secretion and expression of IL-2.

The literature reports the expression of CD4 by dog neutrophils, which does not occur in other mammalian species, in an experimental parasitic infection model in which the stimulation and signaling of other cell lineages were observed (HUEMAN et al., 2006). Our results show a reduction in CD4 that was already prominent in the first 2h after irradiation, which may be associated with an immune suppression model in which there is generally a CD4:CD8 pattern inversion of approximately 2:1.

Nonetheless, our data suggest that the observed reduction in a dog model is likely associated with post-radiotherapy immune suppression, which was also observed in the human response to treatment at advanced cancer stages. It is interesting to note exactly the opposite in a model that used an E5-specific peptide vaccine in breast cancer. The peptide was capable of inducing the signaling of naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations and generating a stable memory immune response. In addition, the vaccine activated the total T cell population, and specifically the CD4<sup>+</sup> effectors. The E5 vaccine led to the activation of naive CD45RO<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T cells while signaling CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations to participate in the general immune response (YU et al., 2000; WARKE et al., 2001).

Here, a decrease in CD4<sup>+</sup> cells was observed after irradiation. A decrease in the CD4CD45RO<sup>+</sup> subpopulation may also occur because at 30 days after irradiation, the number of CD4 cells was still low compared with the nonirradiated control (TEFT et al., 2006). We suggest that the effects observed in our study are associated with the loss of essential enzymes that co-signal clonal expansion, possibly interfering with IL-2R transcription.

The reduction in proliferative capacity may be associated with the possible inability of the irradiated cells to undergo repair, a process that is usually completed within a few hours after irradiation. This possibility would be consistent with the observation of the increasing percentage of CTLA-4<sup>+</sup> cells after irradiation.

Post-irradiation T lymphocyte phenotypic analyses were performed with anti-CD5 monoclonal antibodies, examining co-expression with the CTLA-4 receptor. A CTLA-4 chimeric antibody is used to treat autoimmune diseases, asthma, infections and tissue rejection (WONG et al., 2005). CTLA-4 blocks the costimulation of T lymphocytes by inhibiting binding to B7 molecules. This bond blockage is associated with anergy, apoptosis and tolerance induction in experimental models of autoimmune diseases and tissue transplantation (OAKS et al., 2000).

B7 molecules, present at the APC surface, bind more avidly to CTLA-4, present on the surface of T cells, than to CD28. The B7-to-CTLA-4 bond is capable of sending an inhibitory signal to the activated T cell so that the proliferative response can be effectively interrupted and a smaller amount of IL-2, a T cell growth factor is produced (GIBSON et al., 2007). In this manner, the CTLA-4 bound to B7 molecules is essential to decrease the proliferative response of activated T cells to an antigen and to B7 molecules on the surface of APCs (GIBSON et al., 2007). CTLA-4 is a member of the costimulatory family, has homology to CD28 and binds to the B7 family of ligands. Unlike CD28, CTLA-4 ligation transmits a negative signal in T cells. CTLA-4 expression, although inducible in most T cells, is expressed constitutively on T cells with a regulatory phenotype. The mechanism controlling CTLA-4 expression in human T cells is poorly characterized, so we sought to better understand the mechanism of activation of the CTLA-4 gene (KUHNS et al., 2000). We would like to highlight that in our model, a specific antigen response cannot be characterized

because there is no antigen, but we can infer that exogenous radiation stimulation does not only initiate cell activation but also regulates the cell response.

The previous results, evaluating the entire T cell profile and its subpopulations, suggested an inversion of the CD4:CD8 pattern post-irradiation. These data are supported by the literature, in which it was shown that the CD8+CTLA-4 subpopulation can regulate the responsiveness and function of CD4 cells, justifying this decrease post-irradiation (PARRY et al., 2005).

These findings were later confirmed by Parry *et al.* (2005), who also demonstrated the CTLA-4 regulator role. This receptor was capable of inhibiting cell stimulation and therefore the recognition of peptides via CD3 and CD28 by other CD86+ (B7) populations in the immune system (GREENFIELD et al., 1998). CTLA-4 is a surface molecule that was first cloned from murine CD8 T cells and known as a gene that was rapidly induced (WONG et al., 2005). CTLA-4 shares homology to CD28 and belongs to the costimulatory family of genes (HARPER et al., 1991). Unlike CD28, which is required for the costimulation of naive T cells prior to activation, CTLA-4's function is unclear. CTLA-4 is a high-affinity receptor for B7 ligands and is a member of the Ig gene superfamily in T cells. CTLA-4 and CD28 share similar features: a single disulfide-linked, extracellular IgV-like domain; a function as dimers; and encoding on the human chromosome 2q33-34 (VANDENBORRE et al., 1999). Although CTLA-4 is structurally homologous to CD28 and both use B7 molecules as their natural links, CTLA-4 has a 20- to 100-fold greater affinity for B7 than does CD28 (HARPER et al., 1991). The outcome of CTLA-4 engagement on T cells is the suppression of proliferation by transmitting an inhibitory signal (ENGELHARDT et al., 2006). Thus, CTLA-4 has an immunosuppressive function in modulating T cell proliferation and plays a role in immune tolerance.

A study by Engelhardt et al. (2006) constructed CTLA-4-transgenic mice that displayed constitutive cell-surface expression of CTLA-4 on CD4 and CD8 T cells. In both *in vivo* and *in vitro* T cell responses, CTLA-4 overexpression inhibited T cell activation. This inhibition was dependent on B7 and CD28, suggesting that overexpressed CTLA-4 inhibits responses by competing with CD28 for B7 binding or by interfering with CD28 signaling. In addition, the expression of the transgenic protein decreased the number of CD25+Foxp3+ T cells in these mice but did not affect the cells' suppressive ability (JONULEIT et al., 2001).

A subset of T cells with potent immunoregulatory properties, regulatory T cells (Tregs), has been identified. These cells constitutively express CTLA-4, CD4, CD25, GITR and Foxp3 (TAKAHASHI et al., 2000; SHEN et al., 2005). It has been hypothesized that Tregs inhibit the development of autoreactive T cells (PERKINS et al., 1996). Thus, T cells that express CTLA-4 play a crucial role in immune homeostasis.

The precise control of CTLA-4 expression is complex, and the mechanism controlling CTLA-4 expression in T cells remains unclear. Unlike CD28, whose expression is constitutive, CTLA-4 expression is induced on activated T cells, whereas CTLA-4 expression is constant on Tregs (TAKAHASHI et al., 2000; SHEN et al., 2005; WARKE et al., 2001). Based on a differential gene expression analysis of naive CD45RA and memory CD45RO human T cells, we identified the CTLA-4 gene as one that is expressed significantly higher after stimulation in the memory CD45RO+CD4+T cell subset, suggesting a mechanism for subset-specific expression (TEFT et al., 2006; HODI et al., 2003).

An antitumoral response was also observed when the CTLA-4 receptor was capable of blocking tumoral immunity. Patients with ovarian carcinoma previously received a vaccine that increases the presentation of products originating from the tumor by dendritic cells and limits tumoral immunity strength. A similar event was described in patients with encephalomyelitis who experienced a reduction in CD4+ cells when their CD8CTLA-4 cells were stimulated (QUEZADA et al., 2006).

## **7.5 Conclusion**

Radiation has induced phenotypic differences in lymphocyte lineages, reducing CD5 and CD4 T cell subpopulations and increasing CTLA-4 expression. The profile of the immune response depended on the time after irradiation. Despite a limited radiation site, a systemic response was observed as well. The immune response profile did not show a statistically significant difference for dose kinetics varying from 2 to 6 Gy, so the doses were not taken into consideration. The time kinetics did clearly show alterations in the analyzed cell receptors.

This knowledge may improve cancer radiation treatments. Further studies of these assays, including testing for other biomarkers, should be performed. Such knowledge enhances the quality of life of those patients undergoing external radiotherapy. Currently, immune cell counts are used during irradiation protocols. In the near future, the monitoring of the lymphocyte subpopulations in relation to the radiation dosage will permit a better understanding of the status of the immune response, leading to a better prognosis in the treatment of cancer patients.

## **8 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO COMPARATIVO DE LINFONODOS JUGULODIGÁSTRICOS EM RADIOTERAPIA DE CABEÇA E PESCOÇO NO CÃO**

### **8.1 Introdução**

O câncer de cabeça e pescoço representa 10% dos tumores malignos em nível mundial. Esses tumores podem envolver vários sítios, como a cavidade oral, laringe, faringe, glândulas salivares, dentre outros (CARDOSO et al., 2005). Uma manifestação clínica importante dos tumores de cabeça e pescoço é representada pelas metástases linfonodais. Essa manifestação pode refletir um tumor de sítio primário cujos clones iniciais apresentam elevada capacidade de metastatização.

O linfonodo pode constituir um ambiente favorável ao crescimento de células tumorais, mas provavelmente também desencadeia respostas imunológicas que repercutem no sítio primário (AMAR et al., 2000). A presença de linfonodo metastático no pescoço é o sintoma principal em cerca de 12% dos pacientes com câncer da cabeça e pescoço (LIMA et al., 1999). Linfonodos hiperplásicos são frequentemente encontrados durante os esvaziamentos cervicais (LIMA et al., 1999). Tsakraklides, Olson e Kersey (1974), descreveram quatro padrões principais de reação de linfonodos, sendo eles a hiperplasia folicular, hiperplasia paracortical, linfonodos não estimulados e hiperplasia sinusal associada à histiocitose. Fatores relacionados às características dos linfonodos cervicais metastáticos são amplamente estudados e contribuem para a definição do prognóstico dos pacientes com tumores de cabeça e pescoço (MARTINS, 2007).

A radioterapia pode ser usada com eficácia tanto exclusivamente quanto como adjuvante na terapia dos pacientes com gânglios clinicamente positivo (SILVA; ARRUDA, 2008). Os resultados do tratamento, seja com cirurgia e/ou radioterapia, são reservados na maioria dos casos, sendo que alguns estudos demonstram melhores resultados em pacientes que foram tratados com radioterapia aliada à cirurgia (LIMA et al., 1999). O papel da radioterapia no

tratamento dos tumores de cabeça e pescoço mudou a partir da década de 70. Strong, em 1969, analisou a ação da radioterapia pós-operatória e observou um melhor controle loco regional das metástases em linfonodos cervicais.

A radiação exerce efeito citotóxico seletivo em células cancerosas, mas esse efeito ainda não é completamente conhecido, no entanto, as células em divisão são radiosensíveis e, conseqüentemente, células tumorais rapidamente proliferativas são especialmente vulneráveis à radiação. Um dos efeitos colaterais do tratamento radioterápico é a ação citotóxica, em doses terapêuticas, sobre células em divisão de tecidos normais (TOLEDO, 2006). Radioterapia, cirurgia e quimioterapia correspondem às principais alternativas de tratamento do câncer, sendo cada vez mais utilizadas de forma combinada. Além delas, hormônios e modificadores da resposta biológica têm lugar nesse arsenal terapêutico. A radioterapia é uma ferramenta bastante eficaz no tratamento do câncer. Quando bem indicada, os riscos envolvidos na sua utilização são amplamente superados pelos benefícios que traz (TOLEDO, 2006).

Este estudo tem como objetivo descrever as alterações histopatológicas observadas em linfonodos jugulodigástricos de um cão submetido a irradiações de cabeça e pescoço com Cobalto 60 ( $Co^{60}$ ), uma vez que a radioterapia constitui uma modalidade terapêutica amplamente utilizada no tratamento do câncer de cabeça e pescoço.

## **8.2 Material e Método**

A fase experimental do estudo foi realizada no Biotério do Centro de Preparação de Peças e Pesquisas Anatômicas (CPPPA), da disciplina de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais (FCMMG). O trabalho foi aprovado pelo CPPPA e pela Disciplina de Anatomia. O protocolo de pesquisa experimental com animais foi aprovado seguindo a Declaração de Helsinki (1975, revisada em 1983) e as Normas Internacionais de Proteção aos Animais. Os animais foram tratados conforme a Lei nº 6.638, de 08 de Maio de 1979, Decreto nº 24.645 de 10 de Julho de 1934 e de acordo com os princípios éticos do CPPPA.

Foi utilizado um cão macho, de porte pequeno, sem raça definida, com peso de 10 kg, cedido pelo canil do Setor de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. O cão utilizado foi preparado nas 24 horas que antecederam as irradiações pelo Técnico responsável pelo Biotério do CPPPA. Esse preparo constou de jejum para a anestesia e acondicionamento em baia individual. O animal chegou ao referido biotério já vacinado pelo canil da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. O animal foi anestesiado, a cada irradiação, com quetamina na dose de 5 mg/kg e xylazina na dose de 2 mg/kg, por via intravenosa.

As irradiações foram realizadas no Centro de Radioterapia do Hospital São Francisco, com a utilização de um aparelho Theratron 80®, com uma fonte de Cobalto 60 e distância fonte superfície (DFS) de 80 cm. O tamanho do campo utilizado foi de 13 x 17 cm<sup>2</sup>. As doses aplicadas foram avaliadas para atingir 95%, com 2,5 cm de profundidade. O cão recebeu uma dose semanal de 2 Gy durante o período de 2 semanas, totalizando 4 Gy. A região submetida às irradiações foi a região lateral esquerda da cabeça e pescoço do cão, por ser uma área onde existem grandes vasos, músculos e órgãos do sistema sensorial e linfático, com destaque para a grande cadeia de linfonodos cervicais superficiais e profundos, sendo, portanto, uma região que reúne vários tipos de tecidos que são muito bem vascularizados. Utilizou-se uma proteção de chumbo na região dos olhos.

Ressalta-se que não foram observados sinais clínicos como palidez das mucosas, opacidade e queda dos pelos após as doses de radiação. A eutanásia do animal foi realizada com a administração intravenosa de 10 mL de cloreto de potássio (KCl).

Após as irradiações e eutanásia do animal, procedeu-se à dissecação da região da cabeça e pescoço do cão. A tela subcutânea da pele foi divulsionada com bisturi e tesoura romba. Após a pele ser rebatida, expondo as estruturas superficiais do pescoço, foi rebatido também o músculo platísmo e a tela subcutânea subjacente. Foram retiradas a lâmina superficial e a lâmina pré-traqueal da fáscia cervical, com subsequente retirada de um linfonodo jugulodigástrico esquerdo (pertencente à área irradiada) e um linfonodo jugulodigástrico direito (não pertencente à área irradiada). Os linfonodos foram então fixados em solução aquosa de formaldeído a 10%. O estudo histopatológico foi feito através da confecção de lâminas coradas por hematoxilina-eosina e análise realizada por microscopia óptica.

### 8.3 Resultados

Após a análise histopatológica do linfonodo jugulodigástrico direito, não pertencente à área irradiada, pode-se observar que a região periférica apresentava regiões mais coradas que a medular, mas isso foi pouco visível, exceto por poucas áreas de maior pigmentação. A cápsula era visível e bem delimitada com a presença de adipócitos. As trabéculas que se projetariam da cápsula não foram visíveis nessa lâmina, onde também não havia nódulos linfóides; e que foi tomada por um tecido conjuntivo denso desordenado jovem, como indicou o grande número de células com núcleo volumoso (fibroblastos, não fibrócitos). Além disso, houve numerosas fibras colágenas densas dispostas aleatoriamente, envoltas em pouca substância fundamental amorfa, confirmando que o tecido era tecido conjuntivo denso desordenado com presença de calcificação em alguns vasos, como mostra a Figura 31 abaixo, com respectiva imagem ilustrativa de um linfonodo com trabéculas e nódulos linfáticos (linfócitos agregados).

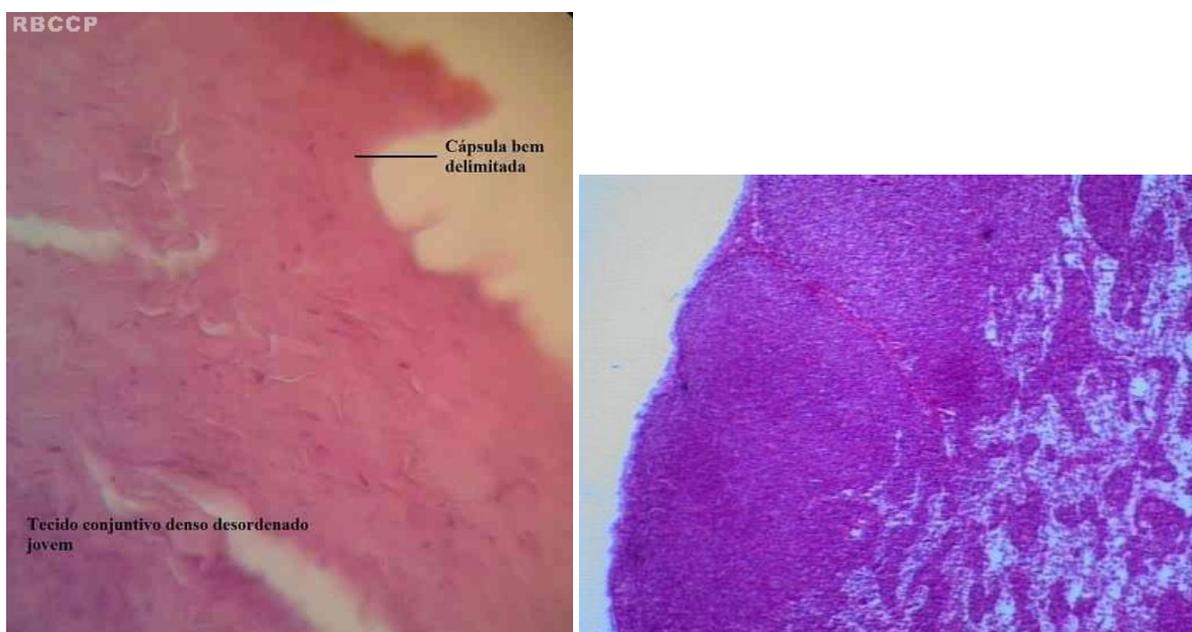


Figura 31. Fotomicrografia revelando ausência de trabéculas e nódulos linfóides no centro do linfonodo jugulodigástrico direito (aumento 400X, coloração hematoxilinaeosina). E respectiva imagem ilustrativa de um linfonodo com trabéculas e nódulos linfóides (linfócitos agregados).

Já após a análise histopatológica do linfonodo jugulodigástrico esquerdo, pertencente à área irradiada, pode-se observar todas as características presentes no linfonodo direito; entretanto foi observado também que: na cápsula, as camadas celulares e de fibras estavam descontínuas, sugerindo a perda das junções celulares, formando seios de imagem negativa (Figura 32); pronunciada fibrose densa ordenada no centro da peça, circundada por tecido conjuntivo denso desordenado, aparentando ser uma infiltração de tecido conjuntivo denso ordenado, acompanhada da presença de numerosos vasos, indicando tecido em atividade (Figura 33); vasos hiperemiados no tecido conjuntivo denso desordenado da cápsula e do "infiltrado"; tecido conjuntivo denso desordenado também descontínuo, dando a impressão de rachaduras no tecido, havendo apenas dois pontos de maior coloração na periferia do tecido.



Figura 32. Fotomicrografia de lâmina mostrando desconexão da cápsula do linfonodo jugulodigástrico esquerdo (aumento 400X, coloração hematoxilinaeosina).



Figura 33. Fotomicrografia evidenciando fibrose ordenada no centro do linfonodo jugulodigástrico esquerdo (aumento 400X, coloração hematoxilinaeosina).

## 8.4 Discussão

### 8.4.1 Anatomia e fisiologia da drenagem linfática cervical

O tratamento dos linfonodos regionais é com frequência uma parte integrante do manejo terapêutico dos tumores malignos da cabeça e pescoço. Para se entender como deve ser direcionado o tratamento dos linfonodos no câncer de cabeça e pescoço, deve se conhecer primeiramente a anatomia e a fisiologia da drenagem linfática cervical, assim como a fisiopatologia da disseminação de células metastáticas provenientes de tumores malignos que afetem a região da cabeça e pescoço.

O desenvolvimento de metástases é a característica mais marcante das neoplasias malignas. A função de filtro dos linfonodos faz com que essas estruturas constituam importantes sítios de metástases (AMAR et al., 1999). Geralmente, as células provenientes de tumores malignos que se encontram distantes da linha média do pescoço são drenadas para grupos de linfonodos

ipsilaterais. Já os tumores localizados na linha média do pescoço ou próximos a ela, bem como os tumores provenientes da nasofaringe e do terço posterior da língua costumam gerar metástases para grupos de linfonodos contralaterais (CUMMINGS, 1993).

Estudos ultrassonográficos e dissecações de espécimes identificaram um grupo de cerca de 20 linfonodos na região superior do pescoço que estabelecem a comunicação entre a cadeia de linfonodos da veia jugular interna e a cadeia de linfonodos espinhais. Esse grupo de linfonodos é responsável pela drenagem linfática da nasofaringe, orofaringe, parte superior da laringe e hipofaringe, além de receber vasos linfáticos eferentes do colar linfático cervical (composto pelos linfonodos submentais, submandibulares, retro faríngeos, linguais, parotídeos, retro auriculares e occipitais). Esses linfonodos são denominados linfonodos jugulodigástricos ou subdigástricos (CUMMINGS, 1993). Lindberg (1973) revisou a localização de linfonodos metastáticos em 2044 pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço não tratado. Os linfonodos jugulodigástricos foram o grupo mais comumente envolvido em todos os tumores de sítio primário estudados. O grupo de linfonodos da cadeia jugular foi o grupo mais acometido quando os tumores em estudo eram tumores de nasofaringe. As metástases contralaterais foram mais comuns que as metástases ipsilaterais. Apesar de observações clínicas sugerirem que o envolvimento metastático de vários linfonodos regionais usualmente progride em uma ordem da região superior para a região inferior do pescoço, todas as cadeias de linfonodos devem ser cuidadosamente examinadas a fim de se evitar a não identificação de linfonodos metastáticos (CUMMINGS, 1993).

#### **8.4.2 Reatividade linfonodal em tumores de cabeça e pescoço**

No câncer de cabeça e pescoço, assim como em cânceres de outras regiões, os linfonodos regionais geralmente apresentam sinais de reatividade, que apresenta ainda significado desconhecido (AMAR et al., 2006). São descritos na literatura quatro padrões de reação de linfonodos no câncer de cabeça e pescoço. São eles: a) hiperplasia folicular, onde se encontra hiperplasia de centros germinativos na cortical do linfonodo, com a formação de folículos secundários; b) hiperplasia paracortical, com aumento de celularidade na área paracortical; c)

linfonodo não estimulado, sem proliferação linfoide; d) linfonodo com hiperplasia sinusal e histiocitose, com hiperplasia das células endoteliais nos sinusoides medulares e a presença de macrófagos (AMAR et al., 2000).

A abordagem da reatividade de linfonodos em pacientes com câncer apresenta problemas conceituais e técnicos. O grande número de linfonodos reativos encontrados nos pacientes com tumor primário oculto contrasta com a agressividade da doença, frequentemente associada à ruptura capsular e substituição quase completa do linfonodo por tecido tumoral (AMAR et al., 2000).

Deve-se ressaltar ainda que é necessária a caracterização das subpopulações de linfócitos T encontrados nas hiperplasias paracorticais, uma vez que a função de linfócitos CD4 (“T helper 1” e “T helper 2”) difere substancialmente entre si, bem como dos linfócitos CD8 (T citotóxico) e de células *natural killer* (NK). Ainda considerar se a presença de outras células, como macrófagos e células dendríticas, que se relacionam com a ativação de linfócitos, apresentação de antígenos e produção de citocinas (AMAR et al., 2000).

Nos tumores da cabeça e pescoço os linfonodos com hiperplasia folicular ou paracortical se localizam na proximidade do tumor, o que favorece o implante e o crescimento das metástases nos linfonodos. A reatividade linfonodal é frequente e ocorre na maioria dos linfonodos regionais em pacientes com metástase cervical de tumor primário oculto (AMAR et al., 2006).

#### **8.4.3 Radioterapia no tratamento de linfonodos cervicais**

A radioterapia deve ser utilizada no manejo dos linfonodos cervicais metastáticos como um tratamento eletivo quando não existem linfonodos palpáveis ou como tratamento pré-operatório ou pós-operatório combinado à dissecação cirúrgica para linfonodos clinicamente positivos (MENDENHALL et al., 1998).

Os linfonodos regionais são considerados no planejamento do tratamento do tumor primário. Com linfonodos clinicamente negativos, o tratamento depende do risco estimado de doença

subclínica nos linfonodos. Com linfonodos clinicamente positivos, o planejamento é influenciado pelo número de linfonodos acometidos, seu tamanho e sua localização (MENDENHALL et al., 1998)

Segundo Sako, Pradler e Marchetta, 1964, o limite inferior de palpação de linfonodos cervicais é de 0,5 cm para linfonodos superficiais e 1,0 cm para linfonodos profundos. Algumas regiões do pescoço são inacessíveis à palpação. Alguns autores discutem na literatura o potencial da Tomografia Computadorizada (TC) e da Ressonância Nuclear Magnética (RNM) para acessar linfonodos cervicais.

Até mesmo o exame histopatológico dos linfonodos não é isento de erros potenciais e secções seriadas são necessárias para encontrar pequenos depósitos de células tumorais. Esses erros podem ser a possível explicação para o fato de que 4 a 8% dos pacientes desenvolvem recidiva após dissecação e exérese de linfonodos nos quais não foi identificada presença de células tumorais após o exame histopatológico das peças cirúrgicas retiradas (CUMMINGS, 1993).

Linfonodos histologicamente positivos foram encontrados quando o pescoço foi considerado negativo à palpação em 4% a 60% dos casos em um estudo realizado por Beahrs e Barber (1962).

O prognóstico tem sido correlacionado com a presença ou ausência de metástases linfonodais e é invariavelmente pior quando os linfonodos são envolvidos. Sistemas de estadiamento clínico subdividem os linfonodos metastáticos de acordo com a localização unilateral ou bilateral, únicos ou múltiplos e móveis ou fixos e ainda de acordo com o tamanho (usualmente menores ou maiores que 2cm a 3 cm de diâmetro) (CUMMINGS, 1993).

A irradiação eletiva de linfonodos é considerada pela alta incidência de linfonodos histologicamente positivos encontrados em pacientes com linfonodos clinicamente negativos e, durante o seguimento de pacientes nos quais unicamente um tumor primário foi identificado e tratado, uma porção apreciável dos pacientes apresentou tardiamente metástases linfonodais. O tratamento eletivo de grupos de linfonodos clinicamente negativos é baseado

em duas condições: primeiramente, o tratamento eletivo é mais efetivo do que o tratamento em pacientes com linfonodos já metastáticos aparentes. Em segundo lugar, a radioterapia eletiva é pelo menos tão efetiva quanto a dissecação dos linfonodos e não está associada com uma morbidade tão grande quando comparada à dissecação (CUMMINGS, 1993).

A dissecação eletiva dos linfonodos e a irradiação eletiva do pescoço são igualmente efetivas no controle de doença subclínica. A decisão de utilizar cirurgia ou radioterapia para o tratamento eletivo dos linfonodos depende do manejo da lesão primária. Pacientes cuja lesão primária tenha sido tratada cirurgicamente devem ser submetidos à dissecação eletiva, e aqueles cuja lesão primária tenha sido tratada com radioterapia devem ser submetidos à irradiação eletiva do pescoço (MENDENHALL et al., 1998).

De acordo com os princípios radiobiológicos a radiação deve ser mais efetiva quando existem poucas células tumorais. O risco de eventos prognósticos adversos, como ruptura capsular, por exemplo, é maior quanto maiores forem os linfonodos (CACHIN, 1982).

Fischel (1935) sugeriu que a resposta satisfatória à radiação só ocorre quando os linfonodos são apenas reativos e não metastáticos. Entretanto, Wizenberg, Bloedorn e Weiner (1972) mencionaram o uso bem sucedido de radiação em 113 pacientes, em todos os quais foi provado o envolvimento metastático através de biópsias dos linfonodos.

A efetividade da radioterapia depende da dose de radiação utilizada, do número e tamanho dos linfonodos envolvidos e do tratamento do tumor de sítio primário. Metástases linfonodais de carcinomas de nasofaringe e fossa tonsilar parecem responder melhor à radiação do que metástases provenientes de tumores de outros sítios (BARTELINK, 1982).

Devido ao fato de que dissecação cervical e radioterapia possuem isoladamente efetividade limitada, muitos centros de tratamento adotam políticas de radioterapia combinada à ressecção cirúrgica. A radioterapia deve ser realizada mesmo antes ou após a cirurgia cervical. A radioterapia pré-operatória é administrada para reduzir o tamanho dos depósitos linfonodais de células tumorais e a radioterapia pós-operatória é administrada para eliminar células tumorais remanescentes que não foram retiradas durante a cirurgia (CUMMINGS, 1993).

Tem sido sugerido que a irradiação de linfonodos possa interferir no sistema imune e promover a disseminação de metástases. Apesar de vários distúrbios do sistema imune seguirem se à radioterapia, a maioria desses distúrbios é transitória e não existe nenhuma evidência conclusiva de que a irradiação regional tenha significado clinicamente adverso nas interações tumorais (TUBIANA, 1989).

#### **8.4.4 Efeitos da radioterapia em linfonodos cervicais**

A utilização da radioterapia no tratamento dos linfonodos cervicais em pacientes com câncer de cabeça e pescoço possui como principais finalidades a diminuição do processo inflamatório que ocorre em linfonodos ativados e a eliminação ou pelo menos diminuição do número de células tumorais metastáticas que por ventura se encontrem no interior dos linfonodos. Poucos estudos na literatura descrevem o mecanismo histopatológico pelo qual a radioterapia é eficaz na diminuição da reatividade linfonodal e no tratamento de metástases no câncer de cabeça e pescoço. Labadie et al. (2000), descreveram os achados histopatológicos em linfonodos provenientes de esvaziamentos cervicais de seis pacientes com carcinoma de células escamosas tratados com radio e quimioterapia (um total de 18 linfonodos). Os achados mostraram fibrose, inflamação, mas nenhuma evidência de malignidade. Em apenas um linfonodo um pequeno foco de carcinoma de células escamosas foi identificado.

Em nosso estudo, a análise histopatológica do linfonodo jugulodigástrico esquerdo, pertencente à região submetida às irradiações com Cobalto 60, mostrou descontinuidade da cápsula, o que evidencia a perda de junções intercelulares, formando seios de imagem negativa. Foi observada também pronunciada fibrose densa ordenada no centro da peça, circundada por tecido conjuntivo denso desordenado, acompanhada da presença de numerosos vasos, indicando tecido em atividade.

Ao mesmo tempo, o estudo histopatológico do linfonodo jugulodigástrico direito, não pertencente à área irradiada, mostrou a presença de cápsula bem delimitada, ausência de trabéculas e nódulos linfoides e presença de tecido conjuntivo denso desordenado. Esses

achados podem ser explicados pela extensão da ação da radioterapia para estruturas além do campo irradiado.

A partir de nossos achados e de descrições encontradas na literatura, podemos inferir que o mecanismo pelo qual a radioterapia é eficaz no tratamento de linfonodos no câncer de cabeça e pescoço é o desencadeamento de um processo inflamatório que leva à destruição não somente das células tumorais, mas também de células constituintes dos linfonodos (linfócitos B, linfócitos T, tecido conjuntivo de sustentação), com subsequente fibrose dos mesmos.

#### **8.4.5 Repercussões clínicas da radioterapia no tratamento de linfonodos cervicais**

A ação da radioterapia no tratamento dos linfonodos no câncer de cabeça e pescoço consiste em desencadear uma resposta inflamatória que leva à morte não somente de células tumorais metastáticas, mas também de células constituintes dos linfonodos (linfócitos B, linfócitos T, tecido conjuntivo de sustentação), ocasionando fibrose desses órgãos.

Essa fibrose dos linfonodos submetidos à radioterapia possui implicações clínicas que podem repercutir negativamente durante o tratamento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Os dois efeitos clínicos mais importantes a serem considerados nesta situação são a obstrução da drenagem linfática cervical e a imunossupressão. Pacientes com obstrução linfática podem apresentar áreas de erisipela ou edema (FERRIGNO et al., 1999). Com relação à imunossupressão, tem sido sugerido que a irradiação de linfonodos pode interferir com o sistema imune e promover a disseminação de metástases. Apesar de vários distúrbios do sistema imune se seguirem à radioterapia, a maioria deles é temporária e não existe evidência conclusiva de que a irradiação regional tenha significado clínico adverso nas interações tumorais (TUBIANA, 1989).

A imunossupressão causada pela radioterapia, mesmo ocorrendo em caráter transitório, pode repercutir clinicamente ao predispor o paciente a infecções bacterianas, fúngicas ou virais que devem ser diagnosticadas e tratadas precocemente para evitar o envolvimento sistêmico dos indivíduos submetidos a essa modalidade terapêutica. Essas infecções são na maioria das

vezes representadas pelas infecções bacterianas da cavidade oral e odontogênicas, herpes simples e herpes zoster e candidíase oral (LOBO; MARTINS, 2009).

As consequências da radioterapia no tratamento dos linfonodos cervicais devem ser acompanhadas de perto pela equipe responsável pelo tratamento dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a essa modalidade terapêutica. Esse acompanhamento deve ter como principal objetivo o controle do edema e erisipela que podem se seguir à obstrução da drenagem linfática e o tratamento das infecções oportunistas que porventura se desenvolvam em decorrência da imunossupressão transitória que acomete esses pacientes, a fim de se evitar o acometimento sistêmico dessas infecções que pode levar ao óbito nessa situação.

## **8.5 Conclusão**

A radioterapia é uma modalidade terapêutica utilizada para o tratamento das metástases linfonodais no câncer de cabeça e pescoço que visa acabar com as células tumorais metastáticas e diminuir a reatividade linfonodal. Porém, seus efeitos atingem também as células constituintes dos linfonodos (linfócitos B, linfócitos T, tecido conjuntivo de sustentação), ocasionando um processo inflamatório que leva à destruição dessas células, que são substituídas por tecido fibroso cicatricial. Ocorre então à perda de função dos linfonodos, o que causa obstrução da drenagem linfática da região drenada para a cadeia linfonodal irradiada e imunossupressão transitória devido à perda de células do sistema imune.

Novos estudos em radioterapia do câncer são necessários a fim de se aprimorar a seletividade da radioterapia, para que no futuro desenvolvam-se técnicas seletivas para a destruição apenas de células tumorais, evitando-se assim a destruição de células constituintes dos tecidos normais para minimizar seus efeitos adversos.

## 9 CONCLUSÃO GERAL

- ✚ Foi desenvolvido um fantoma físico do coração utilizando tecido à base de elastômero com valores de densidade mássica e composição química equivalentes, possibilitando aplicações futuras em experimentos com dosimetria.
- ✚ Foi demonstrada a possibilidade de elaboração de um modelo tridimensional de coração, em formato STL, com detalhamento anatômico de alta precisão, para prototipagem rápida. Entretanto, solucionar questões referentes ao software empregado e à impressão ainda deve ser feito para obtenção de um protótipo físico impresso.
- ✚ A dosimetria da cintilografia de perfusão do miocárdio com Tl-201 elucidou a distribuição da dose absorvida no músculo cardíaco por unidade de atividade do radiofármaco empregado, e do histograma dose versus volume, preconizando valores em mGy. Aonde o ponto máximo da dose absorvida pelo músculo cardíaco foi de 2,64 mGy e o ponto máximo da dose absorvida para a artéria coronária foi de 1,23 mGy. E quando comparado, observa-se que, o músculo cardíaco recebeu maior dose do que a artéria coronária. Assim, estudos em dosimetria a partir de imagens de pacientes podem agora ser elaborados, para cada situação clínica.
- ✚ A radiação induziu diferenças fenotípicas em linhagens celulares, reduzindo subpopulações de células T CD5 e CD4 e aumentou a expressão de CTLA-4. Há dependência temporal no perfil da resposta imune após a irradiação. Apesar da área da irradiação ter sido limitada foi observada uma resposta sistêmica. A avaliação da cinética de variação de dose, 2 a 6 Gy, para o perfil de resposta imune, não apresentou diferenças estatísticas significantes. Enquanto que para a cinética de tempo pode se observar claramente, alterações nos receptores celulares analisados.

- ✚ Através de estudo histológico, as células constituintes dos linfonodos (linfócitos B, linfócitos T, tecido conjuntivo de sustentação) expostas à radiação, demonstrou um processo inflamatório que levou à morte das células constituintes, e essas foram substituídas por tecido fibroso cicatricial, ocorrendo então à perda de função dos linfonodos. Em humanos, tal exposição pode causar obstrução da drenagem linfática da região drenada para a cadeia linfonodal irradiada e imunossupressão transitória devido à diminuição da população de células do sistema imune.

## 10 REFERÊNCIAS

AHN G-O. et al. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. **PNAS**, v. 107, p. 8363-8368, 2010. Supplement 3.

AKHTAR, N. et al. Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xenograft model. *Neoplasia*. v. 6, n. 2, p. 106-116, 2004. ISSN: 1522-8002.

ALEXANDER C.; OBERHAUSEN E. Myocardial scintigraphy. **Semin. Nucl. Med. Pubmed**, v. 25, n. 2, p. 195-201, 1995.

ALICE L. G. Flow Cytometry: First Principles. *Methods in molecular biology*. 2nd ed. V. 263, p. 1-31, 2001.

AMAR A.; RAPOPORT A.; ROSAS M. P. Evaluation of lymph node reactivity in differentiated thyroid carcinoma. **Journ Rev Paul Med**, v. 117, n. 3, p. 1258, 1999.

AMAR A. et al. Metástase cervical de tumor primário oculto: estudo de 107 casos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 27, n. 2, p. 8893, 2000a.

AMAR A. et al. Reatividade linfonodal com metástase cervical de tumor primário oculto – estudo de 24 pacientes. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 28, n. 3, p. 193-197, 2000b.

AMAR A. et al. Reatividade linfonodal e densidade microvascular nas metástases cervicais de carcinoma epidermóide com tumor primário oculto. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 3, p. 382-387, 2006.

ARAÚJO, E. B. “O tecnécio no diagnóstico de patologias”. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.6, p. 31-35, 2005.

ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA. Normatização de equipamentos e técnicas de exames para realização de procedimentos em Cardiologia Nuclear. V. 86, p. 10-12, 2006. Suplemento I.

ATKINS H. L. et al. Thallium-201 for medical use, part3: human distribution and physical imaging properties. **J Nucl Med**, v. 18, p. 133-140, 1977.

AZEVEDO, J. C. et al. Prognóstico em médio prazo da Cintilografia de Perfusão Miocárdica de estresse na unidade de dor torácica. **Arq. Bras. Cardiol**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 5, p. 602-610, 2007.

BAATOUT S.; DERRADJI H. Cytometric methods to analyze radiation effects. **J Biol Regul Homeost Ag**, v. 18, p. 101-105, 2004.

BARTELINK H.; BREUR K.; HART G. Radiotherapy of lymph node metastases in squamous cells carcinomas of the head and neck region. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 8, p. 983-990, 1982.

BAUER T. R. Jr. et al. Very low levels of donor cd18+ neutrophils following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation reverse the disease phenotype in canine leukocyte adhesion deficiency. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3582-3589, 2004. ISSN: 0006-4971.

BAX J.J. et al. FDG-SPECT in the assessment of myocardial viability – Comparison with dobutamine echo. **European Heart journal**, p. D124-D129, 1997. Supplement 18.

BEAHRS O. H.; BARBER K. W. The value of radical dissection of structures of the neck in the management in carcinoma of the lip, mouth and larynx. **Arch Surg**, v. 85, p. 6572, 1962.

BERGMANN S. R. Cardial positron emission tomography. **Semin Nucl Med**, v. 28, n. 4, p. 320-340, 1998.

BETHGE, W. A. et al. Selective t-cell ablation with bismuth-213-labeled anti-tralphabeta as nonmyeloablative conditioning for allogeneic canine marrow transplantation. **Blood**, v. 101, n. 12, p. 5068-5075, 2003. ISSN: 0006-4971.

BOERMA M. et al. Influence of master cells on structural and functional manifestations of radiation-induced heart disease. **Cancer Res**, v. 65, n. 8, p. 3100-7, 2005.

BOERMA M.; HAUER-JENSEN M. Potential targets for intervention in radiation-induced heart disease. **Curr Grug Targets**, v. 11, n. 11, p. 1405-1412, 2010.

BOERMA M.; HAUER-JENSEN M. Preclinical research into basic mechanisms of radiation-induced heart disease. **Cardiology Research and Practice**. Review article, 2011.

BONOW R.O. et al. Myocardial Viability and Survival in Ischemic Left Ventricular Dysfunction. **The New England Journal of Medicine**, p. 1-9, 2011.

BRADLEY-MOORE P. R. et al. Thallium-201 for medical use. Part 2: biological behavior. **J Nucl Med**, v.16, n. 2, p. 133-140, 1974.

BRASILEIRO C. B. et al. <sup>99m</sup>Tc-labeled-1-thio-β-d-glucose as a new tool to temporomandibular joint inflammatory disorders diagnosis. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 68, p. 2261-2267, 2010.

BRAUNWALD. Tratado de doenças cardiovasculares. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

BRAUNWALD; ZIPES; LIBBY. Tratado de Medicina Cardiovascular. 6 ed. Rio de Janeiro: Rocca, 2003. p. 271.

BUSHBERG, J. T. et al. The essential physics o medical imaging. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Willians and Wilkins, 2002. 956 p.

BRANDÃO S. F. **Análise comparativa da taxa de dose em tumor cerebral através de radioterapia megavoltagem 10MV e BNCT – Boron nêutron capture therapy**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares) – Departamento de Engenharia Nuclear, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CABRERA C. E. V. **Avaliação neutrônica da inserção de uma camada transmutadora em um sistema tokamak**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares) - Departamento de Engenharia Nuclear, Universidade Federal de minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

CACHIN Y. Adjuvant chemotherapy in head and neck carcinoma. **Clin. Otolaryngol**, v. 121, n. 3, 1982.

CALVERT J. E. et al. The CD5+B cell: a B cell lineage with a central role in autoimmune disease. **Autoimmunity**, v. 1, n. 3, p. 223-40, 1988.

CAMARGO, A. C. **Otimização dos procedimentos de preparação, marcação e controle de qualidade do Glucarato <sup>99m</sup>Tc para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio.** 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CASTRO A. L. S. et al. Estudo biocinético *in vivo* de análogo da glicose marcado com tecnécio-99m. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS – COLAOB, 2012, Natal.

CEMBER H. Introduction to health physics. **Pergamon Press Inc**, 1983.

CAMICI P.; FERRANNINI E.; OPIE L.H. Myocardial metabolism in ischemic heart disease: Basic principles and application to imaging by positron emission tomography. **Prog cardiovasc dis**, v. 32, n. 3, p. 217-238, 1989.

CARDOSO M. F. A. et al. Prevenção e controle das sequelas bucais em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço. **Radiol Bras**, v. 38, n. 2, p. 105-107, 2005.

CHALELA W. A.; MENEGHETTI J. C. Atualização da Diretriz da Sociedade Brasileira de cardiologia sobre cardiologia nuclear, 2005.

CHRISTOPHER, S.A. et al. Enhanced t cell regeneration following allogeneic bone marrow transplantation (bmt) in xscid dogs co-transplanted with il-7 transduced mesenchymal stem cells (msc). **FASEB Journal**, v. 18, p. 4-5, 2004. Abst. 560.4. ISSN: 0892-6638.

COSTA D. C.; OLIVEIRA J. M. A. P.; BRESSAN R. A. PET e SPECT em neurologia e psiquiatria: do básico as aplicações clínicas. **Rev Bras Psiquiatria**. v. 23, p. 4-5, 2001. Suplemento I.

CUMMINGS B. J. Radiation therapy and the treatment of the cervical lymph nodes, **Otolaryngology Head and Neck surgery**, 1993.

DANTAS B. M. et al. Determination of <sup>99</sup>Mo contamination in a nuclear medicine patient submitted to a diagnostic procedure with <sup>99m</sup>Tc. **Printed in Brazil brazilian archives of biology and technology an international journal**, v. 48, p. 215-220, 2005. Special.

DIGITAL IMAGING AND COMMUNICATIONS IN MEDICINE (DICOM). Part 1: Introduction and Overview. National Electrical Manufacturers Association. 2006.

EINSTEIN A. J. et al. Multiple testing, cumulative radiation dose and clinical indications in patients undergoing myocardial perfusion imaging. **JAMA**, 2010.

ENGELHARDT J. J., SULLIVAN T. J., ALLISON J. P. CTLA-4 overexpression inhibits T cell responses through a CD28-B7-dependent mechanism. **J. Immunol**, v. 177, n. 2, p. 1052-61, 2006.

EVANGELISTA, M. J. A.; MARQUES, F. L. N.; BUCHPIGUEL, C. A. Estudo para preparação e estabilidade de kits de glucarato para obtenção de radiofármaco de tecnécio. Publicación oficial de La Asociación Latinoamericana de Sociedade de Biología y Medicina Nuclear. XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA NUCLEAR, Salvador, 2012. <<http://www.alasbimnjournal.net/congresos/xxvi-congresso-brasileiro-de-medicina-nuclear-9/radiofarmacia/estudo-para-prepara-o-e-estabilidade-de-kits-de-glucarato-para-obten-o-de-radiofarmacos-de-tecnecio-135>>. Acesso: 02 set. 2013.

FALCÃO P. L. et al. The role of T regulatory cells and interleukin-10 (IL-10) in autoimmune and idiopathic diseases – therapeutic perspectives and prognosis. 2013.

FERNANDES H. et al. Avaliação da viabilidade miocárdica. **Acta Med Port**, v. 24, n. S4, p. 989-994, 2011.

FERRIGNO R.; SALVAJOLI J. V. Metástases ganglionares cervicais com primário oculto. In: SALVAJOLI J. V.; SOUHAMI L.; FARIA S.L. Radioterapia em Oncologia. São Paulo: Medsi, 1999.

FILOPEI J.; FRISHMAN W. Radiation-induced heart disease. **Cardiol Rev**, v. 20, n. 4, p. 184-8, 2012.

FISCHEL E. Unilateral block resection of the lymph nodes of the neck for carcinoma. **Am J Surg** ; v. 30, p. 27-35, 1935.

FOGGIATTO J. A. O uso de prototipagem rápida na área médica-odontológica. Tecnologia e Humanismo. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Ano 20, n. 30, 2006.

NICOLAU J. C. et al. Arquivos Brasileiros de Cardiologia – Sociedade Brasileira de Cardiologia, v. 102, n. 3, p.44, 2014. Suplemento I.

GAMBHIR S. S. et al. A Tabulated Summary of the FDG PET Literature. **J Nucl Med**, v.42, n.90050, p.1S-93, 2001.

GAZZINELLI G. et al. Immune response during human shistosomiasis mansoni. X-Production and standartization of an antigeninduced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of shistosomiasis. **J Immun**, v. 89, p. 483-494, 1983.

GIBSON H. M. et al.. Induction of CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent NFAT connecting the proximal promoter. **J.Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3831-40, 2007.

GIRAUD P.; COSSET J. M. Radiation toxicity to the heart: physiopathogy and clinical data. **Bull Cancer**, v. 3, p. 147-53, 2004.

GREENFIELD, E.A., NGUYEN, K.A. AND KUCHROO, V.K. CD28/B7 costimulation: a review. **Critical Reviews in Immunology**, v. 18, p. 389-418, 1998.

GUPTA S. M. et al. Testicular-scrotal content of Tl-201 and Ga-67 after intravenous administration. **Int J Nucl Med Biol**, v. 8, p. 211-213, 1981.

GUYTON, A. C. Tratado de fisiologia médica. Editora Guanabara koogan. Terceira edição americana. RJ, 1969.

HARPER, K. et al. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. **J Immunol**, v. 147, p. 1037-1044, 1991.

HAYS M. T. et al. MIRD Dose Estimate Report no 19: Radiation Absorbed Dose Estimates from 18F-FDG. **J Nucl Med**, v. 43, p. 210-214, 2002.

HERTVELDT K. et al. Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. **Int J Radiat Biol**; v. 71, p. 429-33, 1997. Supplement 4.

HODI F. S. et al. Biologic Activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. **PNAS**, v. 100, n. 8, p. 4712-4717, 2003.

HOSAIN P.; HOSAIN F. Revision of gonadal radiation dose to man from thallium-201. In: Proceedings of the Third International Radiopharmaceutical Dosimetry Symposium. Oak Ridge, TN: Oak Ridge Associated Universities, p. 333-345, 1981.

HUBBELL J. H. Photon Cross Sections. Attenuation Coefficients and Energy Absorption Coefficient from 10 keV to 100 GeV. Washington DC: NBS Publication, 1969.

HUEMAN M. T. et al. Analysis of naive and memory CD4 and CD8 T cell populations in breast cancer patients receiving a HER2/neu peptide (E75) and GM-CSF vaccine. **J cancer immunol immunother**, v. 56, p. 135-46, 2006.

ICRU Report 44: Tissue substitutes in radiation dosimetry and measurement, 1989.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. Radiation Dose to patients from radiopharmaceuticals at ICRP publication no. 53. Oxford, UK: International Commission on Radiological protection, 1983.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals. New York, NY: Pergamon Press; 1988. ICRP Publication 53.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals. New York, NY: Pergamon Press; 2007. ICRP Publication 53.

JANEWAY C. et al. *Imunobiologia*, 2002.

JOHNSON L. L. et al. Technetium-99m glucarate uptake in a swine model of limited flow plus increased demand. **American Society of Nuclear Cardiology**, 2000.

JOHNSON III G. et al. 99mTc-Glucarate imaging for the early detection of infarct in partially reperfused canine myocardium. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 33, n. 3, 2006.

JOHNSON T. I. C.; MCCLURE D.; MCCOURT S. MABDOSE: part 1: Characterization of a general purpose dose estimation code. **Med Phys**, v. 26, p. 1389-1395, 1999.

JONULEIT H. et al. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **J Exp Med**, v. 193, p. 1285-1294, 2001.

JUN OH S. et al. "99mTc-labeled 1-thio-b-D-glucose as a new tumor-seeking agent: Synthesis and tumor cell uptake assay". **Applied Radiation and Isotopes**, v. 64, p. 207-215, 2006.

KATAOKA Y. et al. Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells. **J Radiat Res**, v. 47, p. 245-257, 2006.

KING L.M., OPIE L.H. Glucose delivery is a major determinant of glucose utilization in the ischemic myocardium with a residual coronary flow. **Cardiovasc Res**, v. 39, n. 2, p. 381-392, 1998.

MENEGHETTI J.C., CHALELA W.A. I Diretriz da Sociedade brasileira de cardiologia sobre cardiologia nuclear. Arq Bras Cardiol volume 78, suplemento III, SP, 2002.

KRAHWINKEL W.; HERZOG H.; FEINENDEGEN L. E. Pharmacokinetics of thallium-201 in normal individuals after routine myocardial scintigraphy. **J Nucl Med**, v. 29, p. 1582-1586, 1988.

KUHNS M. S. et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates the size, reactivity, and function of a primed pool of CD41 T cells. **PNAS**, v. 97, p. 12711-12716, 2000. Supplement 23.

KURUDIREK M. et al. Gamma-ray energy absorption and exposure buildup factor studies in some human tissues with endometriosis. **Appl Radiat and Iso**, v. 69, p. 381-388, 2011.

LABADIE R. F. et al. Nodal volume reduction after concurrent chemo and radiotherapy: correlation between inicial CT and histopathologic findings. **American Journal of Neuroradiology**, v. 21, n. 2, p. 310-314. 2000.

LANZA V. et al. Transcriptional response of human umbilical vein endothelial cells to low doses of ionizing radiation. **J Radiat Res**, v. 46, p. 265-276, 2005.

LEE P. J.; MALLIK R. Cardiovascular effects of radiation therapy: Pratical approach to radiation therapy-induced heart disease. **Cardiol Rev**, v. 13, n. 2, p. 80-6, 2005.

LIMA R. A. et al. Metástase cervical de carcinoma epidermóide com tumor primário desconhecido. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 26, n. 6, p. 347-351. 1999.

LIMA R. et al. O Método MPS de Simulação Computacional: aplicações ao estudo do escoamento sanguíneo. Dept. Bioengineering & Robotics, Grad. Sch. Eng. Japan. 2005.

LINDBERG R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer: 1.0.CO;2E/issuetoc">*v. 29, n. 6, p. 1446–1449, 1973.

LOBO A. L. G.; MARTINS G. B. Consequências da radioterapia na região de cabeça e pescoço: uma revisão de literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 50, n. 4, 2009.

LOUAGIE H. et al. Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in gamma irradiated lymphocytes. **Cell Biol Int**, v. 22, p. 277-83, 1998. Supplement 4.

MARTINS E. P. Preservação da veia jugular interna em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço submetidos a esvaziamento cervical radical. 117f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia, São Paulo. 2007.

MECHTHILD W. E. et al. MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells. **J Radiat Oncol**, v. 5, p. 25, 2010.

MCNP –X5 MONTE CARLO TEAM. A general Monte Carlo N-particle transport code manual, version 5. Los Alamos National Laboratory, 2003.

MEEKEN A. et al. Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. **J Mediat Inflamm**, v. 6, p. 185-193, 1997.

MENDENHALL W. M. et al. Head and Neck: Management of the neck. In: PEREZ C. A.; BRADY L. W. Principles and practice of radiation oncology. Philadelphia: LippincottRaven Publishers, 3 ed, 1998.

MENEGHETTI J. C.; CHALELA W. A. Radiotraçadores. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 86, São Paulo, 2006. suppl.1

MENEGHETTI C. J. Diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia sobre angina instável e infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST. **Arq. Bras. Cardiol**, 2 ed, SP, 2007.

MENEGHETTI J. C. Avaliação de paciente com dor torácica e cardiologia nuclear. Instituto do coração da USP. <<http://www.incor.usp.br/conteudo-edico/geral/cardiologia%20nuclear.html>> : acesso: 17/09/2012.

MEURER E. et al. Os Biomodelos de Prototipagem Rápida em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial. **Revista Ato Prototipagem**. Arq. 20100426093830, p. 349-373, 2007.

MIRD pamphlet no.21: A Generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry standardization of nomenclature. **J Nucl Med**, v. 50, n. 3, p. 477-484, 2009.

MONTEIRO M. F. G. A carga da doença associada com algumas causas de internação hospitalar realizada pelo SUS. *Epidemiol. Serv. Saúde* [online], v. 13, n. 1, p. 7-14, 2004. ISSN 1679-4974.

MOORE P. F. et al. Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T- lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. **Tiss Antig**, v. 40, p. 75-85, 1992.

MOREIRA A. E. L. C. et al. Estudo Comparativo entre os Efeitos Terapêuticos da Revascularização Cirúrgica do Miocárdio e Angioplastia Coronária em Situações Isquêmicas Equivalentes: Análise Através da Cintilografia do Miocárdio com <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 2, 2005.

MURPHY C. A. et al. <sup>99m</sup>Tc- glucarate for detection of isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 29-34, 2002.

NIEMOELLER O. et al. MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells. **J Radiat Oncol**, v. 6, p. 29, 2011.

NOWOTNIK D. P. "Physico-chemical concepts in the preparation of technetium Radiopharmaceuticals". In: SAMPSON C. B. Textbook of radiopharmacy theory and practice. **Gordon and Breach Science Publishers S.A**, v. 3, p. 53-72, 1990.

NRI-NÚCLEO DE RADIAÇÕES IONIZANTES, UFMG. Available at <<http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/detalhegrupo.jsp?grupo=0333309JFCSTQ6>>. Acesso: Setembro, 2010.

OAKS M. K. et al. A native soluble form of CTLA-4. **Cell Immunol**, v. 201, p. 144-53, 2000.

OPIE L. H. Metabolism of the heart in health and disease I. **Am Heart J**, v. 76, n. 5, p. 685-698, 1968.

OPIE L. H. Metabolism of the heart in health and disease II. **Am Heart J**, v. 77, n. 1, p. 100-122, 1969.

OPIE L. H. Metabolism of the heart in health and disease III. **Am Heart J**, v. 77, n. 3, p. 383-410, 1969.

OPIE L. H. Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. Relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effects of anoxia. **Circ Res**, v. 38, n. 5, p. 157-74, 1976. Supplement 1.

ORLANDI C. et al. Early Scintigraphic detection of experimental myocardial infarction in dogs with technetium-99m-Glucaric acid. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 32, n. 2, 1991.

PARRY R. V. et al. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. **Mol Cell Biol**, v. 25, p. 9543-9553, 2005. Supplement 21.

PAULA L. R. P. **Segmentação de imagens SPECT/GATED-SPECT do miocárdio e geração de um mapa polar**. 2011. Dissertação (mestrado para o Instituto de matemática e estatística) - Instituto de matemática e estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PEREGRINO A. A. F. et al. Avaliação Tecnológica da Tomografia de Emissão de Pósitrons (PET): Revisão Sistemática e Proposta de Estudo. Relatório 1: Síntese das Avaliações Tecnológicas sobre PET realizadas por Agências Internacionais de ATS na área de Oncologia, 2004.

PERKINS, D., Z. WANG, C. DONOVAN, H. HE, D. MARK, G. GUAN, Y. WANG, T. WALUNAS, J. BLUESTONE, J. LISTMAN, et al. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. **J. Immunol**, v. 156, p. 4154-4159, 1996.

POWSNER R. A.; POWSNER E. R. *Medicine Physics*. 2 ed, 2006.

PRATA P. R. The Epidemiologic Transition in Brazil. **Cad. Saúde Públ**, v. 8, n. 2, p. 168-175, 1992.

QUEZADA S. A. et al. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. **J Clin Invest**; v. 116 p. 1935-1945, 2006. Supplement 7.

ROBERT; MILNE. 1999. Portal. <saude.gov.br /setembro 2012>.

SAHA G. B. Miscellaneous radiotracers for imaging. In: Rayudu GVS, ed. *Radiotracers for Medical Applications*. Boca Raton, Fla: CRC Press; II:119, 1983.

SAHA G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy* Fourth edition. Springer-Verlag. New York, 1998.

SAHA, G. B. "Fundamentals of Nuclear Pharmacy". 5 ed. New York: Springer-Verlag, p. 402, 2004.

SAKO K. et al. Fallibility of palpation in the diagnosis of metastases to cervical nodes surgery. **Gynaecology & Obstetrics**, v. 118, p. 989-990, 1964.

SATO R. C. **Estudo de demanda do radiofármaco 18 F-FDG nas regiões metropolitanas de São Paulo e áreas adjacentes**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de tecnologia nuclear – aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SCHARPFENECKER M, KRUSE J.J.C.M, SPRONG D, RUSSELL N.S, DIJKE P and STEWART F.A. Ionizing radiation shifts the PAI-1/ID-1 balance and activates notch signaling in endothelial cells. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Vol.73, no.2, pp. 506-513, 2009.

SCHRAMM A. M. J. et al. Transição Epidemiológica e o Estudo de Carga de doença no Brasil. **Ciência e saúde coletiva**, v. 9, n. 4, p. 897-908, 2004.

SVENSSON L. G., CRAWFORD E. S. et al. Composite valve graft replacement of the proximal aorta: comparison of techniques in 348 patients. **Ann Thorac Surg**, v. 54, p. 427-439, 1992.

SGOUROS G.; BIGLER R.; ZANZONICO P. DOSCAL: a tumor-incorporating mean absorbed dose calculation program [abstract]. **I Nuci Med**, v. 29, p. 874, 1988. Suplemento.

SHENGWU Z. et al. Developing a canine model of composite facial/scalp allograft transplantation. **Annals of Plastic Surgery**, v. 59, n. 2, p. 185-194, 2007. ISSN: 0148-7043.

SHEN S. et al. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. **J. Clin. Invest**, v.115, p. 3517-3526, 2005.

SILVA F. F. Pré-Manual do Usuário Invesalius 3.0a. Versão 1.0. 2010.

SILVA J. L. F.; ARRUDA F. F. Radioterapia nos tumores de cabeça e pescoço. In: GUIMARÃES J. R. Q. Manual de Oncologia. São Paulo: BBS, 2008.

SNYDER W. S. et al. MIRD Pamphlet no 11: Absorbed Dose per Unit Cumulated Activity for Selected Radionuclides and Organs (PART 1). **Society of Nuclear Medicine**, Reston, VA, 1975.

STABIN M.G. MIRDOSE: personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. **J Nucl Med**, v. 37, p. 538-546, 1996.

STABIN M. G.; STUBBS J. B.; TOOHEY R. E. Radiation dose estimates for radiopharmaceuticals. Washington, DC: U.S. Nuclear Regulatory Commission, U.S. Department of Energy, U.S. department of Health and Human Services; 1996. NUREG/CR-6345.

STRONG E. W. Preoperative radiation and radical neck dissection. **Surg Clin North Am**, v. 49, p. 271-276, 1969.

TAKAHASHI T. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J. Exp. Med**, v. 192, p. 303-310, 2000.

TEFT W. A.; KIRCHHOF M. G.; MADRENAS J. A molecular perspective of CTLA-4 function. **Annu.Rev. Immunol**, v. 24, p. 65-97, 2006.

THOMAS S.R, STABIN M.G, CASTRONOVO F.P. Radiation-absorbed dose from 201 Tl-thallos chloride. **J Nucl Med**, v. 46, p. 502-508, 2005.

TOLEDO J. M. **Avaliação por citometria de fluxo dos parâmetros fenotípicos de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos à irradiação de cabeça e pescoço.** 2006. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares) - Programa de Pós Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares/PCTN Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

TOLEDO J. M. et al. Phenotypic behavior of PBMCs from irradiated dogs based on flow cytometry. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 27, n. 2, p. 309-317, 2013.

TRINDADE B. M.; CAMPOS T. P. R. **Desenvolvimento de sistema computacional para dosimetria em radioterapia por nêutrons e fótons baseado em método estocástico – SISCODES**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares) - Departamento de Engenharia Nuclear, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

TRINDADE B. M.; CAMPOS T. P. R. Stochastic method-based computational system for neutron/photon dosimetry applied to radiotherapy and radiology. **Radiol Bras**, v. 44, n. 2, p. 109-116, 2011.

TRINDADE B. M. et al. Comparative dosimetry of prostate brachytherapy with I-125 and Pd-203 seeds via SISCODES/MCNP. **Radiol Bras**, v. 45, n. 5, p. 267-272, 2012.

TSADRACLIDES V.; OLSON P.; KERSEY J. H. Prognostic significance of the regional lymph node histology in cancer of the breast. **Cancer**, v. 34, p. 1259-67, 1974.

TUBIANA M. The 1987 Franz Buschke lecture: the role of radiotherapy in the treatment of chemosensitive tumors. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 16, p. 763-764, 1989.

UDELSON E. J.; DILSIZIAN V.; BONOW O. R. *Cardiologia Nuclear. Tratado de doenças cardiovasculares*. Rio de Janeiro, v.1, p. 345-391, 2010.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS SIBi/USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso – parte 1/ABNT. 2. ed. Revisada e ampliada. SP. 2009.

VANDENBORRE K. et al. Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. **Immunology**, v. 98, p. 413-421, 1999.

VEINOT J. P.; EDWARDS W. D. Pathology of radiation-induced heart disease: a surgical and autopsy study of 27 cases. **Hum Pathol**, v. 27, n. 8, p. 766-73, 1996.

VIANA L. P.; DIAS A. V.; OLIVEIRA W. S. Visualização 3D do miocárdio em imagens de MRI. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2008. ISBN: 978-85-60064-13-7.

WARKE V. G. et al. Identification of differentially expressed genes in human memory (CD45RO<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup>T lymphocytes. **Immunol. Invest**, v.30, p. 87-101, 2001.

WEBER D. A. et al. MIRD Dose Estimate Report no 13: Radiation Absorbed Dose from Technetium-99m-labeled bone imaging agents. **J. Nucl. Med**, v. 30, p. 1117-1122, 1989.

WOODS S. L.; FROELICHER E. S. S.; MOTZER S. U. *Enfermagem em Cardiologia*, 4 ed: Manole SP, 2005.

WILLIAM D. W. et al. Cytometric Methods to Analyze Ionizing-Radiation Effects. **J Meth Cell Bio**, v. 64, p. 251-268, 2001.

WIZENBERG M. J. et al. Treatment of lymph node metastases in head and neck cancer: a radiotherapeutic approach. **Cancer**, v. 29, n. 6, p. 1455-1462, 1972.

WONG C. K. et al. Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**, v. 141, p. 122-129, 2005.

YU X. et al. The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis. **J Immunol**, v. 164, p. 3543-3553, 2000.